

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und
Jugendmedizin in Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. D. Niethammer**

**Behandlung des Neuroblastoms Stadium IV mit dem chimären
monoklonalen Antikörper ch14.18: Untersuchung zur
Pharmakokinetik und zur Immunogenität des applizierten
Antikörpers**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Murat Dagdelen
aus Sindelfingen**

2004

Dekan: Professor Dr. med. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. D. Niethammer

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. L. Kanz

**Meinen
Eltern**

1. Einleitung

1.1.	Allgemeines zum Neuroblastom.....	1
1.1.1.	Definition	1
1.1.2.	Epidemiologie.....	2
1.1.2.1.	Tumorlokalisation	2
1.1.2.2.	Metastasierung.....	2
1.1.3.	Stadieneinteilung.....	3
1.1.4.	Prognose.....	5
1.1.5.	Symptome	6
1.1.5.1.	Bauchraum.....	6
1.1.5.2.	Brustbereich	6
1.1.5.3.	Hals- und Kopfbereich.....	6
1.1.5.4.	Unspezifische Symptome	7
1.1.6.	Diagnostik	7
1.1.6.1.	Bildgebende Diagnostik.....	7
1.1.6.2.	Labordiagnostik (Urin/Blut).....	8
1.1.6.3.	Knochenmarksdiagnostik	9
1.1.6.4.	Biopsie	10
1.2.	Therapie	10
1.2.1.	Etablierte Therapie.....	10
1.3.	Immunsystem und Immuntherapie	11
1.3.1.	Immunsystem.....	12
1.3.1.1.	Zelluläre Immunantwort.....	12
1.3.1.2.	Humorale Immunantwort.....	13
1.3.2.	Immuntherapie	15

Inhaltsverzeichnis

1.3.2.1.	Bisher zur Immuntherapie zugelassene Präparate	16
1.3.2.2.	Immuntherapeutische Ansätze beim Neuroblastom	17
1.4.	Perspektiven	20
1.5.	Fragestellung	23

2. Materialien

2.1.	Reagenzien	24
2.1.1.	Chemikalien	24
2.1.2.	Pufferlösungen für ELISA.....	24
2.1.3.	Antikörper.....	25
2.1.4.	Einwegartikel	26
2.1.5.	Geräte	27
2.2.	Behandlungsprotokoll.....	27

3. Methoden

3.1.	Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA).....	30
3.1.1.	ELISA zur Bestimmung der HACAs gegen den Ak ch14.18.....	31
3.1.2.	Quantifizierung der HACAs im Referenzserum	33
3.1.3.	Serumspiegelbestimmung des Ak ch14.18 im Serum	33
3.1.3.1	Anti- GD2 Serumantikörper- ELISA.....	33

3.2.	Statistische Methoden	36
3.2.1.	Modellbeschreibung für die HACA- Bestimmung	36
3.2.2.	Modellbeschreibungen für die Pharmakokinetik des ch14.18 ..	36

4. Ergebnisse

4.1.	Entwicklung humaner Anti- Chimär- Antikörper (HACAs).....	38
4.1.1.	Die Berechnung der HACA- Werte.....	40
4.1.2.	Einfluss der Zyklenzahl, Therapiezyklendauer, Antikörperdosis und die unterschiedliche Detektionskörperverwendung auf die HACA- Generierung	46
4.1.2.1.	Einfluss der Anzahl der Behandlungszyklen auf die HACA- Bildung.....	46
4.1.2.2.	Einfluss der Detektionsantikörper auf die Messergebnisse ...	49
4.1.2.3.	Einfluss der Dauer der Therapiezyklen auf HACA Bildung....	50
4.1.2.4.	Unterschiede in der HACA- Bildung bei unterschiedlicher Dosisverabreichung.....	51
4.2.	Pharmakokinetik des therapeutischen Ak ch14.18.....	53
4.2.1.	Vergleich der Nullwerte innerhalb der beiden Behandlungsgruppen	54
4.2.2.	Vergleich der Nullwerte zwischen den beiden Behandlungsgruppen	56
4.2.3.	Vergleich der Maximalwerte beider Behandlungsgruppen	58
4.2.4.	Einfluss der Zyklenzahl auf die Pharmakokinetik des Ak.....	61
4.2.5.	Einfluss der Behandlungsgruppe auf die Pharmakokinetik des Ak ch14.18	63

4.2.6. Einfluss der HACA- Bildung auf die Pharmakokinetik des Ak64

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden65

5.1.1. Konzentration des chimären Antikörpers im Serum66

5.1.2. Humane Anti- Chimär- Antikörper67

5.2. Diskussion der Ergebnisse68

5.2.1. Pharmakokinetik des Antikörpers ch14.1868

5.2.2. Antikörperspiegel76

5.2.3. Immunantwort79

5.2.4. Netzwerk - Hypothese82

5.3. Schwierigkeiten der Krebstherapie und weitere Perspektiven.....83

6. Zusammenfassung 85

7. Literaturverzeichnis..... 88

8. Verzeichnis der Abkürzungen 112

9. Tabellenanhang 113

Danksagung 129

Lebenslauf..... 130

1. Einleitung

„Die Chimäre ist ein feuerspeiendes Ungeheuer aus der griechischen Mythologie mit dem Kopf eines Löwen, dem Körper einer Ziege und dem Schwanz eines Drachen.“

1.1. Allgemeines zum Neuroblastom

1.1.1. Definition

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor des embryonalen Gewebes und gehört zur Gruppe der von der Neuralleiste abstammenden neuroektodermalen Tumoren (182). In der Embryonalperiode wandert ein Teil der Zellen der Neuralleiste, die Vorläuferzellen nach dorsal, wo sie sich zu Melanoblasten und daraufhin zu Melanozyten differenzieren. Ein anderer Teil wandert nach ventral und kann sich dort zu drei verschiedenen Zellarten entwickeln: zu Ganglienzellen des sympathischen Grenzstranges, zu Zellen des APUD- Systems (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation- System) und zu Zellen des Nebennierenmarks und der Paraganglien entlang der Aorta abdominalis.

Diese Zellen werden Sympathogonien genannt, da sie die Ursprungszellen des sympathischen Nervensystems sind. Die pluripotenten Sympathogonien differenzieren sich schließlich zu Sympathoblasten oder zu chromaffinen und nicht chromaffinen paraganglionären Zellen (175), welche ihre Teilungsfähigkeit verloren haben. Es wird angenommen, daß einige Zellen während dieser Entwicklung in undifferenziertem Zustand zurückbleiben und später beginnen, sich ungehemmt zu teilen. Es können daraufhin neuroektodermale Tumoren entstehen (182). Zu diesen zählen neben dem Neuroblastom unter anderem Ganglioneurome, Phäochromozytome, Melanome, kleinzellige Bronchialkarzinome und Osteosarkome (30, 69, 152).

1. Einleitung

1.1.2. Epidemiologie

In Deutschland sind 7,2 % aller malignen Erkrankungen im Kindesalter Neuroblastome (84). Die kumulative Inzidenz beträgt 16,9 Erkrankungen pro hundert Tausend Kinder unter 15 Jahren (92). Damit ist das Neuroblastom der häufigste maligne Tumor im Kleinkindalter (94) und die dritthäufigste maligne Erkrankung im Kindesalter (92), lediglich übertroffen von den akuten lymphatischen Leukämien und den Tumoren des „Zentralen Nervensystems“. Mehr als 90% der Patienten sind bei Diagnosestellung jünger als 6 Jahre, 75% jünger als 4 Jahre und 50% jünger als 2 Jahre. Etwa ein Drittel wird im ersten Lebensjahr diagnostiziert, wobei das mittlere Alter bei Diagnosestellung bei 23 Monaten liegt (179). Bei Jugendlichen und Erwachsenen wird das Neuroblastom dagegen seltener diagnostiziert (40, 67, 97, 120). Auch dann ist es meist weniger aggressiv (110). Eine Geschlechtsbevorzugung ist nicht vorhanden und zum familiären Vorkommen gibt es widersprüchliche Aussagen (96, 113).

In Deutschland ist jährlich mit ca. 130 Patienten zu rechnen (16).

1.1.2.1. Tumorlokalisation

Charakteristisch sind bilaterales Auftreten und wie oben beschrieben frühes Manifestationsalter. Zu etwa 70% ist der Primärtumor abdominal, ca. 15% intrathorakal, 12% im Becken und ca. 34% im Kopf- Halsbereich zu finden. In den restlichen Fällen bleibt die Primärlokalisation unbekannt (42, 179).

1.1.2.2. Metastasierung

Mehr als 50% aller Neuroblastome haben bei Diagnosestellung bereits metastasiert (15, 18). Metastasen werden in regionalen und entfernten Lymphknoten, im Knochenmark, in den Knochen, in der Leber oder in der Haut beobachtet. Seltener werden Metastasen im Gehirn, in der Lunge, im Herzen und anderen parenchymatösen Organen gefunden (14, 49).

1. Einleitung

1.1.3. Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung richtet sich nach der Ausbreitung des Tumors zur Zeit der Diagnosestellung. Die Unterscheidung in verschiedene Stadien ist wichtig für die exakte Therapie und gibt Anhaltspunkte für die Prognose und das Ansprechen der Therapie.

Die Einteilung der Tumorausdehnung in Stadien erfolgte zunächst nach einem Vorschlag von Evans (50).

Stadium I	Begrenzung des Tumors auf das Ursprungsorgan; komplett resezierbar.
Stadium II	Überschreitung des Ursprungsorgans mit oder ohne Befall von regionalen monolateralen Lymphknoten ohne Überschreitung der Mittellinie.
Stadium III	Regionaler Tumor mit oder ohne Befall der bilateralen Lymphknoten mit Überschreiten der Mittellinie.
Stadium IV	Disseminierter Tumor mit Metastasen
Stadium VIs	Lokalisierter Tumor mit Metastasen in der Haut, der Leber und im Knochenmark (ohne radiologisch nachweisbare Skelettmastasen) (19, 21).

Die Stadieneinteilung nach Evans wurde durch eine internationale Stadieneinteilung, die Forbeck- Klassifikation, weiterentwickelt (INSS) (25). In dieser Klassifikation wurde versucht, zusätzlich chirurgische und histologische Kriterien einzubringen.

Folgende Stadien werden im International Neuroblastoma Staging System unterschieden:

1.Einleitung

Stadium 1	Der Primärtumor ist auf das Ursprungsorgan beschränkt und lässt sich chirurgisch komplett entfernen; verdächtige Lymphknoten negativ
Stadium 2a	Der Primärtumor konnte nicht komplett entfernt werden. Die Größenausdehnung überschreitet die Wirbelsäule nicht; kein Lymphknotenbefall in der Umgebung des Tumors
Stadium 2b	Die Größenausdehnung überschreitet die Wirbelsäule nicht; Lymphknoten der gleichen Seite befallen
Stadium 3	Der Primärtumor ist weit über den Ursprungsort mit Befall der Lymphknoten hinausgewachsen und lässt sich nicht komplett entfernen
Stadium 4S	Vorhandener Primärtumor wie beim Stadium 1 und 2 mit Metastasen nur in Haut, Leber und / oder Knochenmark. Der Knochenmarkbefall ist gering (weniger als 10% Tumorzellen im Ausstrich, mIBG für Knochenmark negativ) (19, 21). Stadium 4S nur bei Säuglingen im ersten Lebensjahr.
Stadium 4	Primärtumor und Metastasen an vielen Stellen des Körpers, z.B. in Leber, in Lymphknoten, im Knochen, im Knochenmark, in der Haut und / oder in anderen Organen

Das Neuroblastom weist Besonderheiten auf:

Bei Neuroblastomen des Stadium 4S, die nur im Säuglingsalter beobachtet werden, können Spontanregressionen ohne jegliche Therapie eintreten (11, 52, 169). Somit ist das Stadium 4S ein prognostisch günstiges Stadium.

Zur Erklärung dieses Phänomens wurde schon früh über immunologische Zusammenhänge diskutiert. 1968 berichteten Hellström et al. über in vitro Ergebnisse, wonach Lymphozyten und Serummediatoren die Proliferation von

1. Einleitung

Neuroblastomzellen inhibieren könnten (70). Insgesamt gehört also das Neuroblastom zu den Tumoren mit der höchsten Spontanregressionsrate (179). Evans beobachtete auch eine Ausreifung des Neuroblastom zum weniger malignen Ganglioneurom (49).

1.1.4. Prognose

Die Analyse der Überlebensraten von 2218 Patienten mit Neuroblastom ergab für alle Stadien laut Deutschem Kinderkrebsregister (Internet) eine 5- Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 64%. In der NB90- Studie zeigen sich ähnliche Zahlen: eine Langzeitüberlebensrate von 67% stellte sich bei der Erfassung von 836 Patienten heraus (16). Dabei bestanden zwischen den einzelnen Stadien beträchtliche Unterschiede. Folglich kristallisierten sich zwei Prognosegruppen mit sehr unterschiedlichen Überlebenschancen heraus. Demnach gehörten zur günstigen Prognosegruppe Kinder mit lokalisiertem Tumor, (Stadium 1- 3 und Säuglinge mit Stadium 4S). Die ungünstige Prognosegruppe beinhaltet Kinder mit disseminiertem Tumorbefall, Stadium 4. Die 5- Jahres- Überlebensrate der prognostisch günstigeren Stadien 1- 3 betrug ungefähr 85%. Beim Stadium 4 betrug die 5- Jahres- Überlebensrate trotz neuerer und intensiverer Therapiemodalitäten nur 33% (17). Im Säuglingsalter überwiegen mit 87% die prognostisch günstigen Stadien (Stadium 1, 2, 3, 4S), während bei der Mehrzahl (55%) der über 1jährigen Kinder das prognostisch ungünstige Stadium 4 vorkommt (16). Die Überlebenschancen sind sowohl bei lokalisierter (Stadien 1- 3) als auch bei metastasierter (Stadium 4) Erkrankung im Säuglingsalter besser (16, 157). Für die Stadien 1- 3 betrug die 5- Jahres-Überlebensrate bei Säuglingen 95% gegenüber 80% für Kinder älter als einem Jahr (100). Anhand dieser Zahlen wird die Problematik dieser malignen Erkrankung in der pädiatrischen Onkologie deutlich.

1. Einleitung

1.1.5. Symptome

Die Diagnosestellung des Neuroblastom erfolgt meist erst bei ausgedehntem Tumorbefall (78), da das Neuroblastom keine spezifischen Symptome hervorruft, wie zum Beispiel beim Phäochromozytom, das sich mit krisenhaften Blutdruckerhöhungen schon relativ früh bemerkbar macht. Bei Infiltration des Knochenmarks kann eine Anämie auftreten. Ist das Skelettsystem befallen leiden die Patienten an diffusen Knochen- und Gelenkbeschwerden. Gelegentlich fallen die Patienten auch wegen eines Kompressionssyndroms der großen Gefäße oder anhand einer Querschnittsymptomatik auf, wenn der Tumor in den Spinalkanal einwächst und das Rückenmark komprimiert (182). Die Symptome hängen somit von der jeweiligen Lage des Tumors ab.

1.1.5.1. Bauchraum

Ein Tumor im Bauchraum kann einen Blähbauch verursachen, oder man fühlt eine feste Masse im Bauch. Wenn der Tumor weiter wächst, nehmen die Schmerzen zu, Appetitlosigkeit und auch Probleme beim Wasserlassen und der Verdauung treten auf.

1.1.5.2. Brustbereich

Symptome wie anhaltender Husten, Schmerzen im Brustkorb oder Kurzatmigkeit treten auf.

1.1.5.3. Hals- und Kopfbereich

Der Tumor erscheint meist als Knötchen z.B. um die Augen oder im Kiefer. Manchmal treten blaue Ringe um die Augen auf, die einem Hämatom nach einem erfolgten Stoß ähneln. Eine Farbveränderung der Iris kann ebenfalls auftreten. Drückt der Tumor gegen bestimmte Nerven im Hals oder oberen Brustkorb drückt, kann ein Augenlid schlaff herunterhängen (189) oder eine Pupille verkleinert bleiben.

1.Einleitung

1.1.5.4. Unspezifische Symptome

Von der Lage unabhängige Symptome können Bluthochdruck, Gereiztheit und Fieber, sowie Erröten oder Schwitzen auf einer Körperseite sein. Diese Symptome werden von den Absonderungen des Tumors verursacht, die das Nervensystem beeinflussen. Beim metastasierten Neuroblastom treten häufig Schmerzen in den Armen, Beinen sowie sonstigen Knochen auf.

1.1.6. Diagnostik

1.1.6.1. Bildgebende Diagnostik

Die Lokalisation und Darstellung des Primärtumors bzw. der Metastasen mit bildgebenden Verfahren lässt bereits die Verdachtsdiagnose zu. Die bildgebende Diagnostik beginnt in der Regel mit der Sonographie, die in der Lage ist, den Tumor im Bauchraum oder Halsbereich gut darzustellen. Die Befunde sind wegweisend für die Planung der Folgeuntersuchungen. Diese beinhalten heutzutage eine Computertomographie (CT) oder eine Kernspintomographie (MR, NMR). Mit diesen Untersuchungen kann die Lage und Organzugehörigkeit des Tumors sehr genau beurteilt werden. Auch sehr kleine Tumoren und Tumorreste können mit diesen Verfahren besser erkannt werden. Bei metastasiertem Neuroblastom sollte bei Diagnosestellung eine Kernspintomographie des Schädels zum Ausschluß oder Nachweis von intrakraniellen Metastasen sowie eine sonographische Untersuchung der Leber zum Ausschluß oder Nachweis von Lebermetastasen durchgeführt werden. Während der Therapie wird die Responsebeurteilung, also das Ansprechen des Tumors auf die Behandlung, durch weitere Ultraschalluntersuchungen grob beurteilt. Eine weitere wichtige bildgebende Diagnostik ist die Szintigraphie. Bei dieser Untersuchung wird eine geringe Menge eines radioaktiven Stoffes in die Blutbahn gespritzt. Beim Neuroblastom wird dazu ¹²³Jod markiertes **mIBG** (Meta- Jodo- Benzyl- Guanidin) benutzt. Dieser Stoff, ein Noradrenalinabkömmling, reichert sich spezifisch an Neuroblastomzellen an (58, 118, 172, 181). Mittels einer

1. Einleitung

Spezialkamera können so Absiedlungen des Tumors in Knochenmark, Knochen, Lymphknoten, Leber oder Gehirn sichtbar gemacht werden. Beim Auffinden von Metastasen im Knochenmark oder Knochen mittels mIBG- Szintigraphie, kann eine Skelett-Szintigraphie (Technetium-Szintigraphie) notwendig sein, um zu entscheiden, ob es sich um Knochen- oder Knochenmarkmetastasen handelt. Bei mIBG- negativen Neuroblastomen, welche fast 10% ausmachen (72, 146), können andere Verfahren, wie zum Beispiel eine Somatostatin- Szintigraphie oder eine bildliche Darstellung mit Hilfe des radioaktiv markierten Antikörpers „3F8“ eingesetzt werden (121).

1.1.6.2. Labordiagnostik (Urin/ Blut)

Da das Neuroblastom entwicklungsgeschichtlich ein vom sympathischen Nervensystem abstammender Tumor ist, kann es eigenständig Katecholamine produzieren. Die Abbauprodukte dieser Hormone sind Vanillinmandelsäure (VMA) und Homovanillinsäure (HVA). Erhöhter Blutspiegel von mindestens einem dieser Katecholaminmetaboliten lassen sich bei 90% aller Patienten im Urin und Blut nachweisen (74, 93, 165). Bei erfolgreicher Therapie sinken die erhöhten Metabolitenkonzentrationen meist ab, während sie im Falle eines Rezidivs erneut ansteigen. Deshalb eignen sie sich als Marker zur Bestätigung der Diagnose und als Verlaufsparemeter. Außerdem wird der Quotient aus HVA / VMA als prognostischer Hinweis gewertet. Ein geringer Quotient ist oft mit einer günstigeren Prognose verbunden (49). Die Verfügbarkeit von solch tumorassoziierten Markern ist die Basis für Neuroblastoma- Screenings. Die ersten Neugeborenen- Screenings wurden in Japan in den frühen 70ern durchgeführt (5). Seitdem wurden zahlreiche Studien in Nordamerika und in Europa durchgeführt, um die Folgen solcher Massenscreenings zu untersuchen (5, 38, 88, 116, 155). An der Massenuntersuchung wird kritisiert, dass dadurch Tumoren, die spontan von selbst regressieren, markiert würden. Die Effizienz und Notwendigkeit solcher Massenuntersuchungen sind immer noch in Diskussion (131, 174, 185).

1. Einleitung

Als weiterer Tumormarker kann die Neuronenspezifische Enolase (NSE), ein glykolytisches Enzym, welches hauptsächlich von neuroendokrinen Zellen produziert wird, im Serum nachgewiesen werden (29, 102, 114). Auch hier sind höhere Spiegel mit schlechterer Prognose verbunden (190).

Die LDH (Lactat- Dehydrogenase) und Serum- Ferritinwerte bei Diagnosestellung kann als Parameter zur Risikoabschätzung eingesetzt werden (66): erhöhte LDH und Ferritinwerte gehen gleichermaßen mit schlechterer Prognose einher (51, 164).

Ein weiterer Parameter, der über den Therapieverlauf bei der Behandlung des Neuroblastoms Aufschluß geben kann, ist das Oberflächenantigen GD2. GD2 ist ein Gangliosid, das zur Gruppe der sialinsäurehaltigen Glykosphingolipide gehört. In gesundem Gewebe ist es im zentralen Nervensystem, auf einigen peripheren Nerven, im Nebennierenmark und auf Melanozyten der Haut nachgewiesen worden (128). Sie sind für die Zelladhäsion auf der Basalmembran verantwortlich, dienen der Interaktion zwischen den Zellen, haben Funktionen als Rezeptoren, und können transmembranäre Signale verstärken (145). Das Gangliosid GD2, wird vor allem aber auf Tumoren neuroektodermalen Ursprungs exprimiert (126). Es wird beim Wachstum des Tumors abgeschilfert und gelangt in den Blutkreislauf (99), wo es bei betroffenen Patienten nachgewiesen werden kann. Da seine Konzentration, ähnlich den anderen Markern, bei Verkleinerung der Tumormasse nach einer Therapie absinkt, ist es ebenfalls ein guter Verlaufsparemeter für eine Therapiekontrolle (60, 159).

1.1.6.3. Knochenmarksdiagnostik

Die Analyse des entnommenen Knochenmarks gibt Aufschluß darüber, ob eine Metastasierung ins Knochenmark stattgefunden hat. Knochenmark wird an zwei bis vier Stellen des Beckenknochens entnommen und untersucht.

1. Einleitung

1.1.6.4. Biopsie

Eine Biopsie von Tumorgewebe ist zur histologischen, zytogenetischen und molekulardiagnostischen Diagnostik notwendig. Das Onkogen N-myc, das normalerweise als einzelne Kopie auf Chromosom 2 vorhanden ist, hat sich als bester molekularer Parameter zur Risikodiskriminierung im Tumorgewebe erwiesen (36). Dabei ist das Vorliegen einer N-myc Onkogenamplifikation mit einer fortgeschrittenen Erkrankung (27) und einer schlechten Prognose (16, 156, 160) korreliert. Die Anzahl der N-myc-Kopien kann durch die Therapie nicht beeinflusst werden (156, 161).

Durch eine Chromosomenanalyse der malignen Zellen kann beim Vorliegen einer 1p-Deletion auch von einer schlechten Prognose ausgegangen werden (68).

Diese Biopsie, die auch meistens während der Operation vorgenommen wird, ist auch gleichzeitig ein erster Behandlungsschritt mit dem Ziel der möglichst vollständigen Tumorentfernung bzw. weitestgehenden Reduktion des Tumolvolumens, jedoch ohne den Patienten oder ein Organ zu gefährden. Internationale Kriterien fordern eine histologische Sicherung aus Tumorgewebe oder Knochenmark (26). Ein weiteres Ziel ist somit die Festlegung des Stadiums (Mittellinienüberschreitung, Lymphknoteninfiltration) und Beschreibung von Größe und Lokalisation eines eventuell verbleibenden Resttumors. Allerdings kann in Ausnahmefällen, z.B. bei sehr schlechtem Allgemeinzustand, die Diagnose auch klinisch gestellt werden.

1.2. Therapie

1.2.1. Etablierte Therapie

Die Therapie des Neuroblastoms richtet sich nach dem Stadium des Tumors bei Diagnosestellung. In den Stadien 1 und 2 reicht die chirurgische Resektion des Tumors aus. Sie kann gegebenenfalls, besonders bei regionalem Lymphknotenbefall im Stadium 2, durch eine niedrigdosierte Bestrahlung und

1. Einleitung

Chemotherapie ergänzt werden. Im Stadium 3 wird die Chirurgie mit Bestrahlung und Chemotherapie kombiniert. Das Stadium 4 wird in erster Linie chemotherapeutisch angegangen. Eine chirurgische Resektion kann unterstützend eingesetzt werden. Die allogene und autologe Knochenmarkstransplantation mit hochdosierter Chemotherapeutika, sowie die Anwendung von ¹³¹Jod- mIBG zur nuklearmedizinischen Therapie von Metastasen haben ebenfalls einen festen Platz in der Therapie dieses Stadiums. In Deutschland wird diese Behandlung bei diffuser Metastasierung des Skelettsystems in der Rezidivsituation angewandt. An anderer Stelle wurde auch die de novo- Therapie mit ¹³¹Jod- mIBG und oder ohne hyperbarem Sauerstoff erprobt (73, 89). Stadium 4S wird wie Stadium 3 behandelt, wobei ein Haut- und Knochenmarksbefall oft zurückgeht, wenn der Primärtumor verschwunden ist.

Studien haben gezeigt, dass einige Patienten in den fortgeschritteneren Stadien nach einer „marrow- ablative“ Chemotherapie und autologer (64) oder allogener Knochenmarkstransplantation (KMT) oder Radio mIBG- Therapie langfristig ein krankheitsfreies Überleben erreichen (57, 65, 115, 139, 141, 168). Trotz dieser medizinischen Einsätze sind späte Krankheitsrückfälle nicht ungewöhnlich (45, 75, 138, 173).

Auch der Einsatz von Substanzen zur Förderung von Differenzierungsvorgängen der Zellen, wie das Vitamin A, brachten bisher keine Verbesserung der Prognose (2, 142). Aufgrund dessen, war es essentiell, nach neuen alternativen Therapiemöglichkeiten zu suchen. Eine Ansatzmöglichkeit liegt in der Immuntherapie.

1.3. Immunsystem und Immuntherapie

Unter Immuntherapie oder auch Immunmodulation versteht man die therapeutische Beeinflussung der Immunreaktion, d.h. der Abwehrbereitschaft des Organismus. Die Idee, die der Immuntherapie bei Krebserkrankungen zugrunde liegt, ist die Aufmerksamkeit des Immunsystems gegenüber Krebszellen und

1. Einleitung

damit die Abwehrreaktion so zu beeinflussen, sodass der Tumor vom Körper selbst bekämpft wird.

Dies kann auf verschiedenen Wegen geschehen: Durch die Zufuhr von Immunglobulinen, durch Immunsuppression oder durch aktive spezifische oder unspezifische Immunstimulation (143). Ziel der Immuntherapie bei malignen Erkrankungen ist es also, Tumoren mit Hilfe des körpereigenen Abwehrsystems in Remission zu bringen.

1.3.1. Immunsystem

Das Immunsystem hilft dem Körper bei der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen. Dringt ein fremder Stoff in die Blutbahn ein, wird er durch das Immunsystem erkannt, und der Körper kann auf den Fremdstoff reagieren.

Dabei stehen dem Immunsystem zwei Wege offen:

Man unterscheidet zwischen der sogenannten humoralen Immunantwort, an der lösliche Proteine, die **Antikörper** oder **Immunglobuline**, beteiligt sind, und der zellulären Immunantwort (1).

1.3.1.1. Zelluläre Immunantwort:

Die zelluläre Immunantwort richtet sich gegen virusinfizierte Zellen, Parasiten und Krebszellen. Sie wird durch Zellen, die sogenannten **T-Zellen** oder **T-Lymphozyten**, vermittelt. Die T-Zellen erkennen die infizierten oder körperfremden Zellen und führen zu ihrer Abtötung. Gleichzeitig unterstützen die T-Zellen die Vorläufer der antikörperbildenden Plasmazellen, die B-Zellen oder B-Lymphozyten.

Nach diesen unterschiedlichen Aufgaben unterscheidet man zwischen **zytotoxische T-Zellen** oder **T-Killerzellen**, die fremde Zellen direkt zerstören, indem sie ihre Zellwand durchlöchern, **T-Suppressorzellen**, die eine

1. Einleitung

überschießende Immunantwort unterdrücken und **T-Helferzellen**, die einen B-Zellwachstumsfaktor produzieren

1.3.1.2. Humorale Immunantwort:

Die humorale Immunantwort dient zur Bekämpfung von Bakterien und Viren im extrazellulären Medium. Sie wird durch lösliche Proteine vermittelt. Diese löslichen Proteine werden **Antikörper** genannt, die als Antwort auf eine fremde Substanz (**Antigen**) produziert werden. Antikörper, die zu der Klasse der **Immunglobuline** gehören, werden von den sogenannten Plasmazellen freigesetzt. Es gibt 5 Klassen von Immunglobulinen, die nach Größe, Aufbau, Molekulargewicht und Funktion unterschieden werden und verschiedene Funktionen in der Immunreaktion des Körpers auf körperfremde Substanzen ausüben: IgG, IgA, IgD, IgE und IgM. Wobei die Antikörper der Klasse IgG wiederum in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Für die Immunabwehr des Menschen sind die Immunglobuline der Klasse IgG mit den Subtypen IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 und der Klasse IgM von herausragender Bedeutung.

Immunglobuline zeichnen sich durch ihren flexiblen, Y-förmigen Bau aus. Sie setzen sich aus leichten und schweren Ketten zusammen, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (siehe Abb.1). Die Antigenbindungsstelle liegt in einem Bereich, in dem die Aminosäuresequenz von jedem spezifischen Antikörper verschieden ist. Dadurch ist bedingt, dass der Körper Antikörper gegen fast jedes Makromolekül bilden kann. Sie reagieren sehr spezifisch auf ihr Antigen und bilden einen **Antigen- Antikörper- Komplex** aus, um sie weiteren Immunreaktionen zuzuführen:

1. Einleitung

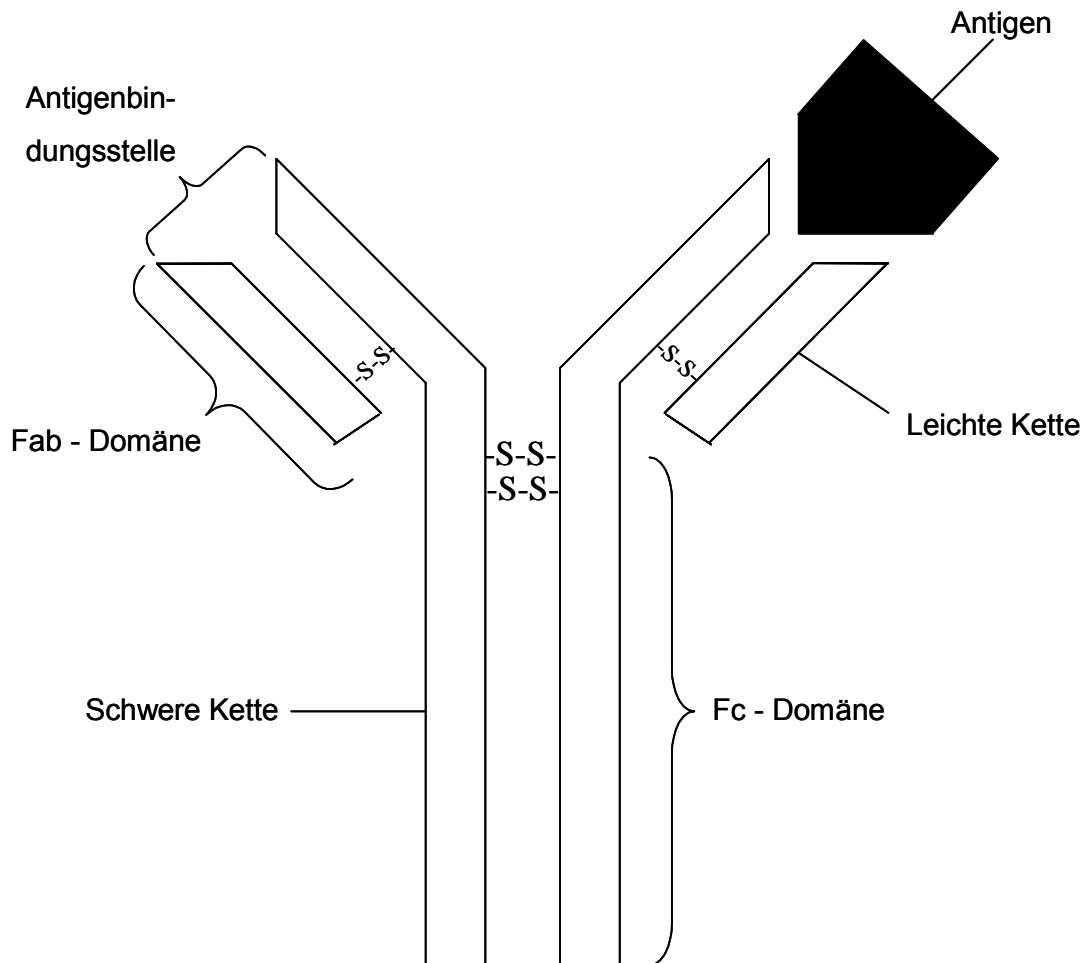


Abb. 1: Ein Immunglobulin- Antikörper schematisch dargestellt

Zum einen können Effektorzellen mit zytotoxischem Potential, die auf ihrer Oberfläche Fc γ - Rezeptoren für Immunglobuline tragen, wie T-Killerzellen, NK-Zellen, Monozyten und Granulozyten, mit den formierten Antigen- Antikörper-Komplexen eine Bindung eingehen und das Antigen neutralisieren, indem sie die Targetzellen lysieren. Diese Reaktion wird antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC- Reaktion; aus dem engl.: Antibody dependant Cellular Cytotoxicity) genannt.

Zum anderen kann sich an die CH- Domäne des Fc- Stücks eines menschlichen Immunglobulins, nach Formation eines Antigen-Antikörperkomplexes der C1-

1. Einleitung

Komplement Protein-Komplex über die C1q- Subkomponente binden und so eine C3- Konversion bewirken. Dadurch wird das Komplementsystem über den sogenannten klassischen Reaktionsweg aktiviert. Allerdings sind nicht alle Immunglobulinsubklassen in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren. Es sind dies beim Menschen Immunglobuline der Subklassen IgG1, IgG3. Die Komplementkaskade setzt sich aus einer großen Zahl an Enzymen, hauptsächlich Proteasen, die Proteine in kleinere Einheiten zerlegen, zusammen. Sie bewirkt den Abbau von körperfremden Proteinen und die Abtötung von Mikroorganismen durch Zerstörung ihrer Zellhülle. Das Komplementsystem ist also seinerseits in der Lage, Targetzellen zu lysieren, Antigen zu opsonieren und dadurch die Elimination des Antigens zu erleichtern und das Immunsystem zu aktivieren. Diese Reaktionsform wird komplementabhängige Zytotoxizität (CDC- Reaktion; aus dem engl.: Complement dependant Cytotoxicity) genannt.

1.3.2. Immuntherapie

Einige Ansätze der Immuntherapie bei bösartigen Tumoren beruhen auf der Verabreichung von Substanzen, die als Immunmodulatoren ("biological response modifiers") bezeichnet werden, was soviel bedeutet wie "Substanzen, die die Immunantwort beeinflussen". Es handelt sich dabei um dieselben Substanzen, mit denen sich die Abwehrzellen im Körper untereinander verständigen und aktivieren, sogenannte Botenstoffe oder auch Zytokine. Einige können bereits auf gentechnischem Wege hergestellt werden und sind somit für die Anwendung in reiner Form verfügbar, andere müssen aus Zellkulturen oder aus dem Blut gewonnen werden. Die bekanntesten Beispiele sind die Interferone und Interleukine.

Eine weitere Möglichkeit besteht im Einsatz von tumorspezifischen monoklonalen Antikörpern. Diese Antikörper müssen im Sinne einer passiven Immunisierung zugeführt werden, da das Immunsystem oft selbst Tumorzellen nicht als „fremd“ erkennt und daher keine Antikörper dagegen bildet. Dadurch werden Krebszellen

1. Einleitung

entweder direkt angegriffen oder andere Zellen und Funktionen der Immunabwehr aktiviert.

Seit der Entdeckung einer Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper durch Köhler und Milstein 1975 (91) besteht die Möglichkeit ihres Einsatzes für eine Immuntherapie. Voraussetzung für die Bindung eines Antikörpers an maligne entartete Zellen und der anschließenden antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität oder der komplementabhängigen Zytotoxizität ist, dass ein tumorspezifisches Antigen vorhanden ist, das am optimalsten nicht auf gesundem Gewebe zu finden ist.

1.3.2.1. Bisher zur Immuntherapie zugelassene Präparate

Antikörper gelten als ein relativ neuer Ansatz der Therapie von diversen Krankheiten und schafften erst vor wenigen Jahren mit Präparaten wie Rituxan[®] oder Mabthera[®] (Rituximab, IDEC-C2B8), Zenapax[®] (Daclizumab), Simulect[®] (Basiliximab) oder Herceptin[®] (Trastuzumab) ihren Durchbruch in der Medizin.

Rituximab (Rituxan[®]) ist der erste chimäre Antikörper (144), der als monoklonaler Antikörper für die Behandlung von Krebs in den USA zugelassen wurde. Rituximab wurde von IDEC Pharmaceuticals Corporation (USA) entwickelt und in Zusammenarbeit mit Genentech, Inc. (USA), Hoffmann La Roche (Schweiz) und Zenyaku Kogyo Co Ltd. (Japan) entwickelt. Rituximab bindet an das auf nahezu allen B-Zellen vorhandene CD20 Antigen. Durch spezifische Bindung des anti-CD20- Antikörpers werden diese gezielt erreicht und zerstört (43). Ein Nutzen ist zurzeit nur für das sogenannte folliculäre Lymphom der niedrigmalignen B- Non-Hodgkin- Lymphome wissenschaftlich nachgewiesen worden (111, 112, 117). Mabthera[®] ist für die Behandlung von Patienten mit folliculärem Lymphom im Stadium II- IV angezeigt. Auch beim folliculären Lymphom wird eine Behandlung aber zunächst einmal nur für solche Patienten in Frage kommen, die gar nicht auf eine andere Therapie angesprochen haben oder bei denen ein Rückfall aufgetreten ist (151).

1. Einleitung

Daclizumab (Zenapax[®]) ist ein humanisierter rekombinanter Antikörper auf IgG1-Basis mit 10 Prozent murinem Anteil, der wie der chimäre monoklonale Antikörper Basiliximab (Simulect[®]) zur Prophylaxe akuter Abstoßungsreaktionen nach einer Nierentransplantation zugelassen wurde (12). Beide sind immunsuppressive monoklonale Antikörper, die an den Interleukin 2- Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen mit hoher Selektivität binden, deren Proliferation verhindern und damit die Interleukin 2 gesteuerte Abstoßungsreaktion über die T-Lymphozyten unterdrücken. Daclizumab wird bei Nierentransplantierten in Kombination mit Cyclosporin A eingesetzt, das selektiv und reversibel die Bildung von Interleukin 2 hemmt (47). Durch das Zusammenspiel beider Substanzen kann das Immunsystem somit zweifach und selektiver unterdrückt werden (180).

Herceptin[®] ist das erste gegen ein Onkogen gerichtete Medikament, das die Prognose von Mamma- CA nachweislich verbessert und zu besseren Therapieresultaten führt, wenn es allein oder in Kombination mit einer Chemotherapie verwendet wird (98). Aufgrund des erwiesenen klinischen Nutzens von Herceptin[®] bei HER2- positiven (human epidermal growth factor receptor 2) Patientinnen wird das Medikament jetzt in der EU zur Behandlung von Frauen mit hohen p185HER2-/neu Werten empfohlen. Wie klinische Studien gezeigt haben, entfaltet Herceptin bei sorgfältig ausgewählten, HER2-positiven Patientinnen eine überlegene Wirkung und verbessert die Überlebenschancen (167) und die Lebensqualität (105) von Brustkrebspatientinnen wesentlich. Dank dieser Eigenschaften wurde Herceptin[®] inzwischen weltweit in über 40 Ländern zur Behandlung von metastasierendem Mamma- CA zugelassen; aufgrund der offensichtlichen klinischen Wirksamkeit des Präparats bei dieser Anwendung wird zurzeit seine Verwendung zur Therapie von Mamma- CA im Frühstadium geprüft. Herceptin[®] wurde von Genentech, Inc, South San Francisco, CA entwickelt.

1. Einleitung

1.3.2.2. Immuntherapeutische Ansätze beim Neuroblastom

Das Gangliosid GD2, das zum ersten Mal von Schulz et al. (159) beschrieben wurde, scheint ein ideales Antigen für diese Form der Therapie für das Neuroblastom zu sein, da es in großem Ausmaß auf den Tumorzellen neuroektodermalen Ursprungs vorhanden ist (126, 159, 170). Es macht bis zu 28% aller Ganglioside auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen aus (187). Zusätzlich ist es in die Zellmembranen eingelagert, wodurch nach einer Bindung von Antikörpern und einer nachfolgenden Aktivierung von ADCC- oder CDC-Mechanismen eine Zellyse besser induziert werden kann, als wenn das Antigen nur auf der Oberfläche der Zellen aufgelagert wäre. Bisher wurde GD2 auf allen Neuroblastomzelllinien und im Biopsiematerial nachgewiesen (30, 159). Verschiedene Antikörper, 3F8 (33, 34), 14G2a (56, 63, 129) und ch14.18 (62, 132, 177, 189) die GD2 spezifisch binden, wurden in den letzten 15 Jahren entwickelt und in mehreren klinischen Studien sowohl an Neuroblastom (31, 35), als auch an Melanompatienten getestet (3, 4, 130). Es wurde gezeigt, dass durch diese Antikörper das Wachstum von Neuroblastomherden in vivo unterdrückt, und die Tumoren sogar in eine komplette Remission gebracht werden können (126, 128). Einer dieser Antikörper, der murine monoklonale Antikörper 14G2a, ist ein Immunglobulin der Klasse IgG2a. Dieser Mausantikörper bindet trotz seiner murinen Bestandteile auch humanes Komplement und T-Zellen. Aufgrund dessen kann es nach dieser Bindung zur Lyse von Tumorzellen über CDC und ADCC vermittelte Mechanismen kommen (8).

Dieser Antikörper war auch an der Universitäts- Kinderklinik Tübingen in einer Phase I Studie zur Behandlung von Neuroblastomen eingesetzt worden. Bei zwei von sechs beurteilbaren Patienten konnte eine komplette Remission und bei weiteren zwei Patienten eine partielle Remission erzielt werden. Zwei weitere Patienten sprachen auf die Therapie nicht an (6).

1. Einleitung

Therapien mit den murinen Antikörpern werfen aber folgende Probleme auf:

1. Eine immunologische Reaktion; d.h. zunächst die Bildung humaner anti-Maus- Antikörper (HAMAs) gegen Epitope des therapeutisch eingesetzten Antikörpers beeinflusst im negativen Sinn dessen primäre Wirkung. Durch die Aggregation wird die Serumhalbwertszeit verkürzt. Der Tumor kann nicht mehr im vollen Umfang markiert werden und zytotoxische Mechanismen wie die antikörperabhängige und komplementvermittelte Zellzytotoxizität und Antigenlyse sind reduziert. Diese endogenen Antikörper führen entweder zu einer Neutralisierung des eingesetzten Antikörpers oder können durch Ablagerungen von Immunkomplexen und nachfolgende Aktivierung von Entzündungsreaktionen zu schweren Organschäden führen (37, 119, 162).
2. Die Halbwertszeit der therapeutischen murinen Antikörper verglichen mit der der menschlichen Immunglobuline ist recht kurz (107).
3. Murine Antikörper können die ADCC und die CDC nicht in gleichem Maße aktivieren wie menschliches Immunglobulin (104).

Diese Problematik führte allgemein zu einer weiteren Entwicklung des Antikörpers. Um der ungewollten Immunreaktion zu entgehen, wurde versucht, die Immunreaktion zu mindern oder vollständig zu unterbinden; Zum einen durch die Anwendung von immunsupprimierenden Substanzen (135, 136) oder durch die Konstruktion von Mensch / Maus chimären oder humanisierter Antikörper (59, 62, 63, 148) mittels rekombinanter DNA-Techniken. In diesem Fall ist es der Antikörper ch14.18, der 1989 von Dr. Stephen Gillies bei Damon Biotech (Needham Heights, MA) entwickelt wurde (59). Die schweren und leichten Ketten der variablen Region des Fab- Fragments, die 30% des Antikörpers ch14.18 ausmachen, stammen noch aus der des murinen Idiotyps 14G2a, und sind somit spezifisch gegen das Oberflächenantigen GD2 gerichtet. (Idiotypen sind

1. Einleitung

Antikörper, die die gleiche Bindungsspezifität, aber einen unterschiedlichen konstanten Anteil haben.) Die konstante Region, einschließlich das gesamte Fc-Fragment besteht demgegenüber aus humanem Eiweiß (123) und ist deshalb weniger immunogen und die Eliminierungshalbwertszeit ist verlängert (59, 124). Für diesen Antikörper wurde sowohl in vitro, als auch in vivo beim Einsatz gegen Melanom- und Neuroblastomzellen beobachtet, dass er besser als sein muriner Idiotyp zur Vermittlung von ADCC- und CDC- Mechanismen in der Lage ist (7, 8, 59, 125, 127).

Weiterentwicklungen dieses immuntherapeutischen Ansatzes in jüngster Zeit eröffnen jedoch Perspektiven für eine neue, vierte Säule in der Krebstherapie.

1.4. Perspektiven

Mit diesem therapeutischen Antikörper ch14.18 erzielte man unter anderem eine Verbesserung des „Targeting“ (Bindung an die GD2- positiven Zellen) und der Verträglichkeit (62). Zur weiteren Steigerung der nachgewiesenen Wirkung und des Antitumoreffektes, also der Immunstimulation und Immunmodulation des Antikörpers, wurden Antikörper- Zytokin- Fusionsproteine hergestellt (20, 95, 108, 109, 163). Dabei verbindet man die Carboxy-Enden der schweren Kette der Antikörper mit einem Zytokin.

Das Fusionsprotein ch14.18- IL2 besteht aus dem chimären Antikörper ch14.18, dessen Carboxy- Terminus der schweren Kette mit Interleukin 2 (IL2) verbunden ist (108, 109). Diese Verbindung soll bewirken, dass die IL2- Konzentration am Wirkort erhöht wird und die systemischen Nebenwirkungen sinken.

Ebenso verhält es sich mit dem Fusionsprotein ch14.18- GMCSF (132). Der therapeutische Antikörper ch14.18 ist mit dem Granulozyten- Monozyten- Kolonie-stimulierenden Faktor (GMCSF) verbunden. Dadurch wird ebenso das GMCSF direkt zum Tumor transportiert, seine lokale Wirkung steigt und die systemischen Nebenwirkungen nehmen ab.

1. Einleitung

Da der GMCS- Faktor wie der Name es schon sagt, die zur Phagozytose befähigten Granulozyten und Makrophagen stimuliert und IL2 ein Wachstums-, Aktivierungs-, und Differenzierungsfaktor für T-, B- und NK- Zellen ist, erhofft man sich durch Anwendung der Fusionsproteine eine lokale Immunstimulation durch die Zytokine und damit eine erhöhte zellvermittelte Anti- Tumor- Aktivität.

In gegenwärtigen Untersuchungen wurde körpereigenes IgM gegen Neuroblastomzellen im Serum gesunder Individuen gefunden (48, 133, 134). In Tierversuchen sah man einen Wachstumsstillstand oder eine Regression des Tumors bei den mit diesen IgM behandelten Ratten (41, 134), wobei dieses IgM gegen das Oberflächenantigen NB-p260 gerichtet ist. Praktische Verwendung aber findet sich zurzeit nicht mit den natürlichen Antikörpern, jedoch lassen diese Untersuchungen eventuell auf neue Therapiechancen hoffen.

Mit wachsendem Wissen über die Wirkungsmechanismen von Antikörpern und durch die modernen Verfahren der Gentechnologie können Antikörper zunehmend so abgewandelt werden, daß sie den Therapieanforderungen besser entsprechen. So lassen sich z.B. "vermenschlichte" (humanisierte) Versionen der bisher gebräuchlichen Mausantikörper herstellen, um die beschriebene Immunreaktion zu vermeiden.

Bei humanisierten Antikörpern stammen nur noch die kleinen, Antigenbindenden Regionen (complementarity determining regions, CDR) von den Maus-Antikörpern; der gesamte Rest entspricht einem humanen Antikörper- Protein. Allerdings muß man bei diesem Vorgehen häufig einen Qualitätsverlust hinsichtlich der Bindung des Antikörpers an sein Zielmolekül hinnehmen. Bei den so genannten chimärisierten Antikörpern, wie in unserer Arbeit verwendeten Antikörper ch14.18, werden deshalb größere Regionen des Maus- Antikörpers eingebaut. Damit entsprechen die Antigenbindenden Regionen komplett denen des ursprünglichen Maus- Antikörpers. Das verbessert die Bindung, kann aber wieder in stärkerem Maß zu Problemen mit Abstoßungsreaktionen führen.

Eine weitere Entwicklung zielt deshalb darauf, die Antikörper vollständig zu humanisieren. Dazu hat man transgene Mäuse (transgen= Bezeichnung für

1. Einleitung

höhere Organismen, die fremdes Erbgut tragen) erzeugt, in deren Genom der gesamte Bereich, der zur Bildung von Antikörpern erforderlich ist, vom Menschen stammt. Werden diese Mäuse immunisiert, dann erzeugen sie "menschliche" Antikörper. Ob diese dann tatsächlich die erwarteten Vorteile haben, müssen die bereits laufenden und zukünftigen klinischen Versuche zeigen. Auch andere intelligente Ansätze zur Herstellung großer Bibliotheken menschlicher Antikörper werden heute verfolgt. Beispielsweise kann man durch Klonierung der jeweiligen menschlichen Gene sehr große Bibliotheken in Phagen oder Bakterien erzeugen, die das entsprechende Antikörperfragment dann auf ihrer Oberfläche exprimieren. Antikörperfragmente, die spezifisch an ein interessierendes Zielmolekül binden, findet man nun einfach, indem man dieses an einer festen Grundlage fixiert und die ganze "Klon- Bibliothek" dazugibt. Phagen bzw. Zellen, die das passende Antikörperfragment an ihrer Außenseite tragen, binden an das Zielmolekül, während der Rest der Klone abgespült werden kann. Auf der Matrix bleiben also nur die Phagen bzw. Bakterien zurück, deren Erbgut die Information für das gesuchte Antikörperfragment enthält. Dieses läßt sich dann beliebig vermehren. Auch kann man deutlich kleinere, auf wesentliche Teile des Moleküls reduzierte Antikörper konstruieren, die leichter in das Tumorgewebe eindringen. Eine weitere Strategie ist die Herstellung von Antikörpern, die zwei oder drei Merkmale auf zwei verschiedenen Zellen (eines auf der Tumorzelle, eines auf einer Immunzelle) zugleich erkennen und sich daran festheften können. Solche "bispesifischen" oder sogar "trispesifischen" oder "trifunktionalen" Antikörper sollen Immunzellen gezielt an Tumorzellen heranzuführen. Mit diesen neuen Techniken und der Anwendung der Antikörpertherapie nicht zur Bekämpfung großer Tumoren, sondern in solchen Situationen, in denen möglichst wenige Krebszellen im Körper sind, werden sich in Zukunft eventuell weitere erfolgversprechende Einsatzmöglichkeiten ergeben.

1.5. Fragestellung

Die Generierung einer anti- Antikörperreaktion, in diesem Fall eine humane Anti-Chimär- Antikörperbildung (HACA), hängt von vielen verschiedenen Faktoren ab. Hierzu gehören die Antikörperdosis, die Anzahl der Injektionen, die Immunogenität des Antikörpers und die Immunkompetenz des Rezipienten. Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Untersuchung von Pharmakokinetik und Immunreaktion in Begleitung einer Studie. In dieser Arbeit wird die humorale Immunreaktion des Neuroblastom- Patienten auf den therapeutischen Antikörper ch14.18 und dessen Pharmakokinetik untersucht.

Eine polyzentrische Studie in Deutschland mit Neuroblastompatienten stellt Patientenseren zur Verfügung:

Im Rahmen des seit 1998 durchgeführten und noch laufenden Studienprotokolls „Adjuvante Immuntherapie bei der Behandlung des Neuroblastoms Stadium IV“ (NB97) wurden Seren von 55 Patienten untersucht, wobei von 22 Patienten bei jedem Behandlungszyklus auch noch Proben zu Pharmakokinetikanalysen zur Verfügung standen.

Das Gesamtpatientenkollektiv unterscheidet sich hinsichtlich der Dosis (applizierter Menge), der Zyklendauer („5- Tage-Behandlungsgruppe“ vs. „10- Tage- Behandlungsgruppe“) und der Zyklenzahl.

Und die dafür bestimmten Parameter:

1. Die Quantifizierung der humoralen Immunantwort, also der Produktion endogener humaner Anti- Chimär- Antikörper (HACAs) von 55 Patienten aus der fortlaufenden Neuroblastomstudie NB97.
2. Bestimmung der Pharmakokinetik des chimären ch14.18 von den 22 Patienten

2. Material

2. Material

2.1. Reagenzien

Alle Reagenzien ohne besonderen Herstellernachweis waren über die Universitätsapotheke zu beziehen.

2.1.1. Chemikalien

Aqua bidest.

BSA (bovines Serum Albumin) von Sigma Fraktion

Disialoganglioside-GD2 (Approx. 95%) von Sigma, Taufkirchen

Ethanol 99,8% von Merck

H₂O₂ (30%) Perrhydrat von Merck, Darmstadt

H₂SO₄ 2,5 mol/l

OPD (o-Phenylenediamine tablets) von Sigma, Taufkirchen

TWEEN 20 von Sigma

2.1.2. Pufferlösungen für ELISA

Catching buffer: (pH 9.6)	1500 mg Na ₂ CO ₃
	2930 mg NaHCO ₃
	200 mg NaN ₃
	ad 1000 ml H ₂ O

Phosphatpuffer (PBS Dulbecco`s)	Gibco BRL
------------------------------------	-----------

Blockpuffer	PBS Dulbeccos`s
-------------	-----------------

2. Material

	1% BSA	
	0,5% TWEEN 20	
Waschpuffer (I) (Assay Puffer)	PBS Dulbecco`s 0,05% TWEEN 20	
Waschpuffer (II)	0,1% BSA 0,05% TWEEN 20 100 ml PBS (10fach konzentriert)	
Probenverdünnungspuffer	Waschpuffer 0,02% BSA	
Staining Puffer Ph 5,25	5100 mg Zitronensäure 9150mg Na ₂ HPO ₄ ad 1000 ml H ₂ O	
Substratlösung	10mg OPD (o-Phenylenediamine tablets) 25 ml Staining Puffer 5 µl H ₂ O ₂ 30%	Sigma, Taufkirchen Merck, Darmstadt

2.1.3. Antikörper

14G2a Mouse Anti- Human Disialoganglioside GD2 Kat.Nr.: 554272	BD PharMingen
Disialoganglioside-GD2 Approx. 95%	Sigma, Taufkirchen

2. Material

Purified myeloma protein
Human IgG1, kappa
Prod.no.: 115-035-044

Sigma, Taufkirchen

Detektionsantikörper (1):
Goat-Anti-Human IgG(γ),
F(ab')₂ fragment
Peroxidase-labeled
Kat.Nr.: 214-1002

Kirkegaard (kpl),
Gaithersburg
Biozol

Detektionsantikörper (2):
Peroxidase- conjugated F(ab')₂
Goat Anti-Human IgG
Fragment Fc γ
Code no.: 109-036-098

Jackson Immuno Research
PA 19390
Dianova, Hamburg

2.1.4. Einwegartikel

Mikrotiterplatten:
Immuno Plate MaxiSorp,
96 wells flat bottom, high binding capacity
(Kat.Nr. 439454)
Immuno Module MaxiSorp C8
Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel
Pipettenspitzen verschiedener Größe
Reaktionsgefäße verschiedener Größen

Nunc, Dänemark

Nunc, Dänemark
Greiner
Sarstadt, Greiner
Eppendorf

2. Material

2.1.5. Geräte

Microplate Reader Milenia Kinetic Analyzer MKA200, DPC

Laborwaage: Sartorius Kern 440-47, Sartorius PT 300

Multipipette

Eppendorf

Pipetman Pipetten

Gilson

Transferpette®-8 Multikanalpipette

Brandt

Zentrifugen: Hettich Micro 22R

Mixer („Vortexer“): Janke & Kunkel IKA^R MS1 Minishaker

Computerprogramme:

SOFTmaxPRO 3.0

Molecular Devices
Corporation

JMP 4.0

SRS Institute
in Gary/ NC

WinWord

Microsoft

Excel

Microsoft

2.2. Behandlungsprotokoll

Die Behandlung des Neuroblastoms erfolgt in Deutschland in der Regel im Rahmen der Behandlungsstudie für Säuglinge, Kinder und Jugendliche mit Neuroblastom (Neuroblastomstudie NB 97) (16). Dies ist ein "Behandlungsplan" nach dem über 80 Kinderkliniken des Bundesgebiets und der Schweiz vorgehen. Einer der ersten Therapieschritte sieht die Entnahme eines kleinen Gewebestücks zur mikroskopischen und molekulargenetischen Untersuchung und die chirurgische Entfernung des Tumors vor. Die Biopsie ist notwendig, um die Diagnose mikroskopisch zu sichern und besondere molekulare Risikofaktoren für den Patienten (z.B. erkennbar an der Vermehrung des Onkogens N-myc) frühzeitig festzustellen. Auf der Grundlage der Risikofaktoren erfolgt die

2. Material

Eingruppierung als Beobachtungspatient, Standardrisikopatient oder Hochrisikopatient. Die Art der weiteren Behandlung ist abhängig vom Alter des Patienten, von der Ausbreitung der Erkrankung (Stadien) und von weiteren Risikofaktoren wie der N-myc-Amplifikation.

Während Beobachtungspatienten zunächst unter Beobachtung bleiben, erhalten Standardrisiko- und Hochrisikopatienten stets eine Chemotherapie. Ein Teil der Patienten aus der Hochrisikogruppe, die alle Patienten mit Nmyc- Amplifikation (auch Stadium 1!) und Kinder mit Neuroblastom des Stadiums 4 beinhaltet, bekommt zusätzlich eine sogenannte Megatherapie, die mit besonders hohen Medikamentendosen und vom Patienten selbst gewonnenen Blutstammzellen arbeitet.

Die Hochrisikopatienten erhalten im Anschluß an die Polychemotherapien mit nachfolgender autologer oder allogener Knochenmarkstransplantation (KMT) oder „Erhaltungstherapie“ („Chemotherapie-Fortsetzung“) noch eine Antikörpertherapie.

Diese Immuntherapie mit dem therapeutischen Antikörper ch14.18 ist ein wesentlicher Bestandteil der Neuroblastomstudie NB97. Sie besteht aus 6 Therapiezyklen im Abstand von 2 Monaten (Gesamtdauer 1 Jahr). Jeder Zyklus dauert etwa 1 Woche und beinhaltet 5 bis 10 Tage mit Antikörperinfusionen über je 8 Stunden, (im Einzelfall auch 12 Stunden), und durchgehender Schmerzprophylaxe. Dies ist notwendig, da die Hauptnebenwirkung der Behandlung Schmerzsymptomatik ist. Sie sind üblicherweise gut durch die frühzeitige Gabe von Schmerzmitteln (Morphin, Paracetamol) kontrollierbar, können in Einzelfällen aber durchaus erheblich sein. Die Schmerzen entstehen vermutlich durch die Bindung des Antikörpers an periphere Schmerzfasern und sind rasch reversibel. Nervenzellen des Gehirns und des Rückenmarks sind durch die Bluthirnschranke geschützt.

Weitere mögliche Nebenwirkungen sind allergische Hautausschläge mit starkem Juckreiz, flüchtige Gelenksbeschwerden, Husten und Allgemeinsymptome wie bei einer Serumkrankheit bis hin zum allergischen Schock. Sie entstehen durch

2. Material

körpereigene Antikörperbildung gegen fremdes Eiweiß. Der injizierte Antikörper ch14.18, mit dem das Neuroblastom behandelt wird, besteht zu ca.75% aus menschlichem und zu ca. 25% aus tierischem (Maus)- Proteinanteilen. Nach bisherigen Erfahrungen sind leichte Nebenwirkungen dieser Art häufig, schwere aber äußerst selten. Wie bei jedem neuen Arzneistoff können bislang unbekannte, auch schwerwiegende Nebenwirkungen mit dauerhaften Schäden nicht vollständig ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu den Nebenwirkungen unter Chemotherapie kommt es aber durch die Antikörpertherapie zu keiner Beeinträchtigung des Knochenmarks (d.h. keine erhöhte Blutungs- oder Infektionsgefahr).

Um die Wirksamkeit der Behandlung zu kontrollieren und um Nebenwirkungen rechtzeitig begegnen zu können, werden Blut-, Knochenmark-, Gehör-, Herz-, Röntgen-, Ultraschall- und weitere Untersuchungen in gewissen Abständen durchgeführt.

Der Antikörper wird also gemäß dem Behandlungsschema nach hochdosierter Chemotherapie und Megatherapie adjuvant eingesetzt, mit der Zielsetzung, die letzten Reste des Tumors zu eliminieren.

3. Methoden

3.1. Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)

Für den experimentellen Teil der Arbeit wurde ausschließlich ELISA Technik angewandt, um spezifische Antikörper zu quantifizieren.

Testprinzip

Als antigenhaltige Festphase werden Polystyrol- Mikrotiterstreifen oder MaxiSorp Platten mit aufgereinigten, biochemisch charakterisierten Antigenen verwendet.

Im ersten Inkubationsschritt binden sich bei positiven Proben die nachzuweisenden Antikörper aus dem verdünnten Patientenserum an die Festphasen- gebundene Antigene.

Im zweiten Inkubationsschritt werden diese Antikörper mit Peroxidase- markierten Anti- Human- Antikörpern nachgewiesen.

Im dritten Inkubationsschritt werden die gebundenen Antikörper durch eine Farbreaktion mit einer Chromogen- /Substratlösung dargestellt. Die Extinktion der entstehenden Farblösung ist proportional zur Antikörper- Konzentration im Patientenserum.

Wir benutzten bei der Untersuchung der Patientenseren drei verschiedene ELISAs:

Der eine Assay zur Bestimmung der humanen Antikörper gegen den therapeutisch verabreichten Antikörper ch14.18, also der HACAs.

Der zweite Assay diente der Quantifizierung von humanem IgG im Serum.

Der dritte Assay diente der Bestimmung von anti- GD2- Antikörper und dadurch wurde der Titer des therapeutisch eingesetzten Antikörpers ch14.18 im Serum bestimmt.

3.1.1. ELISA zur Bestimmung der humanen Antikörper gegen den Ak ch14.18 (human anti chimeric antibodies = HACA)

Die Bestimmung der humanen Antikörper, die gegen den murinen Anteil des zur Therapie verwendeten Antikörper ch14.18 gerichtet sind erfolgte mittels Platten, die mit dem murinen Antikörper 14G2a beschichtet wurden. Das Prinzip der Bindung der HACAs auf den murinen Antikörper basiert auf der partiellen strukturellen Identität zwischen ch14.18 und 14G2a.

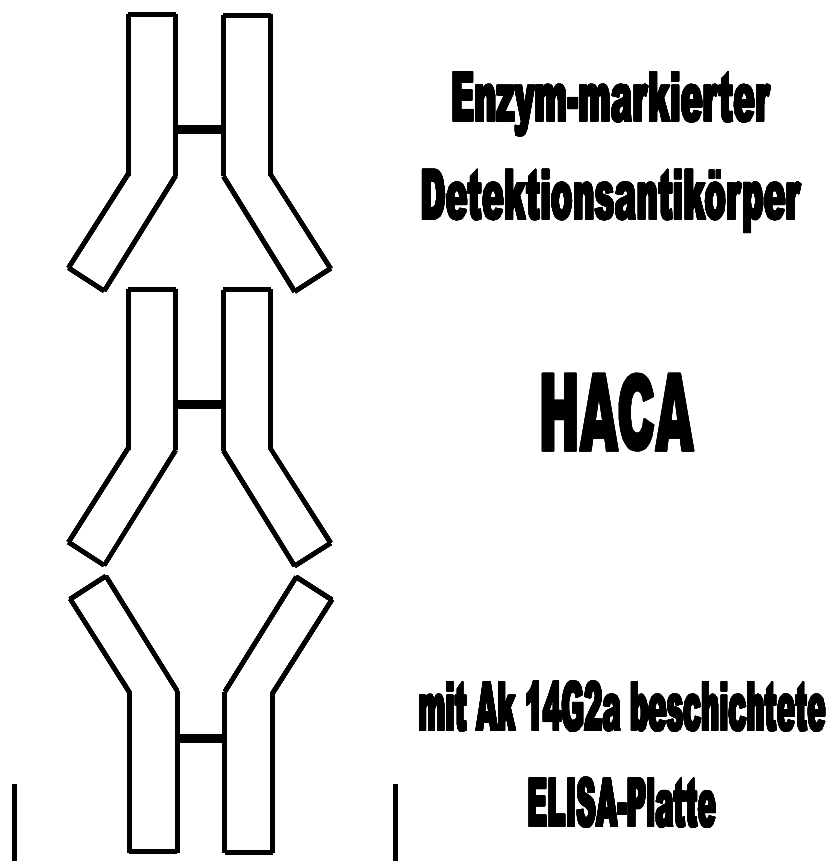


Abb. 2: Funktionsprinzip der ELISAs zur Bestimmung der humanen Antikörper gegen den Antikörper ch14.18, der sogenannten HACAs.

3. Methoden

Zuerst wurden Mikrotiterplatten mit dem Antikörper 14G2a in der Konzentration von 5µg/ml alkalischem Puffer (pH=9,6) beschichtet. Der im Patientenserum vorhandene Antikörper wurde daran gebunden und mit Hilfe eines zweiten Antikörpers (anti- IgG), der mit einer Peroxidase konjugiert war, detektiert.

Hierfür mußten die folgenden Arbeitsschritte ausgeführt werden:

Zunächst wurden 96 Loch Mikrotiterplatten (NUNC) mit 50µl pro Vertiefung (=well) 14G2a als Coat Antibody beschichtet und über Nacht bei 4⁰C inkubiert. Danach blockierte man bei Raumtemperatur die residualen Bindungsstellen der Platte mit 150µl Blockpuffer pro well für 1h auf dem Schüttler. Nach dreimaligem Waschen mit dem Waschpuffer (I) und Ausklopfen wurde als Standard, ein HACA positives Serum, in verschiedenen Verdünnungen wie folgt aufgetragen:

Standard: 1/ 5000, 1/ 2500, 1/ 1250, 1/ 625, 1/ 312,5, 1/ 156,3 und 1/ 78,1
verdünnt in Probenverdünnungspuffer

Anschließend wurden die Patientenproben in verschiedenen Verdünnungen jeweils in Doppelbestimmung wie folgt pipettiert:

Proben: 1/ 20, 1/100, 1/ 500, 1/ 2500, und bei Bedarf 1/ 12500 und 1/ 62500
verdünnt in Probenverdünnungspuffer

Nach 1h Inkubation bei Raumtemperatur und viermaligem Waschen und Ausklopfen pipettierte man 100µl/ well Konjugat, ein Ziegen- Anti- Human IgG Antikörper, in einer Konzentration von 1:5000 in Probenverdünnungspuffer hinzu. Es folgte eine weitere Inkubationszeit von 1h bei Raumtemperatur und dreimaliges Waschen und Ausklopfen, bevor 50µl/ well frisch angesetzte Substratlösung hinzupipettiert wurde. Gestoppt wurde die Reaktion innerhalb 20 min, aber frühestens nach 10min in Dunkelheit durch die Zugabe von 50µl/ well 2.5M Schwefelsäure.

3. Methoden

Die Auswertung erfolgte mit einem Microplate Reader, über die Extinktionsbestimmung der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 490-630nm. Anhand der Standardkurve konnte man die Konzentration des anti-ch14.18 im Patientenserum errechnen. Zur Konzentrationsbestimmung der Patientenseren wurden diejenigen Verdünnungen herangezogen, deren Konzentrationen im logarithmischen Bereich der Standardkurven lagen. Die jeweiligen Konzentrationen, in „units“ gemessen, wurden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert (Methoden 3.1.2).

3.1.2. Quantifizierung der HACAs im Referenzserum

Zur Quantifizierung der zuvor gemessenen HACAs, die in units gemessen wurden, mussten wir zunächst die Konzentration unseres Standards bestimmen. Dafür trugen wir den Standard (1) in die erste Spalte der Platte in den Verdünnungen 1/ 5000, 1/ 2500, 1/ 1250, 1/ 625, 1/ 312,5, 1/ 156,3 und 1/ 78,1 auf. In Spalte 2 und 5 trugen wir, zur Konzentrationsbestimmung der zuvor in den Experimenten ermittelten units, IgG- Serum mit aufgereinigtem HACA in den 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 Verdünnungen auf. In die 6.Spalte kam zuletzt die Verdünnungsreihe vom Standard- IgG (human) auch in der Konzentration 320 ng/ml, 160 ng/ml, 80 ng/ml, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml und 2,5ng/ml.

3.1.3. Serumspiegelbestimmung des Ak ch14.18 im Serum

3.1.3.1. Anti- GD2 Serumantikörper– ELISA

Die Messung des Serumspiegels des applizierten chimären monoklonalen Antikörpers ch14.18 erfolgte mittels eines ELISA mit dem Funktionsprinzip dargestellt in Abbildung 3 (71).



Abb.3: Funktionsprinzip der ELISAs zur Bestimmung des Serumspiegels des Ak ch14.18

Den zur Messung benutzten Mikrotiterplatten wurde als Antigen 5µl Disialoganglioside- GD2 in der Konzentration von 2,5 µg/ml gelöst in H₂O und 40µl 100%iges Ethanol zugegeben. Die pipettierte Menge betrug somit 45 µl/Vertiefung. Die Bindung erfolgte durch vollständiges Auftrocknen des Gangliosids. Hierzu wurde das Gangliosid 10 min auf dem Schüttler gemischt. Daraufhin wurde die Flüssigkeit durch Luftströmung in der Sterilbank (Laminoflow) verdampft. Anschließend wurde die getrocknete Platte geblockt. Dazu wurden die Platten mit 150µl/ well Blockpuffer 45min ebenfalls bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten abgekippt und ausgeklopft und mit 180µl Waschpuffer gewaschen. Die Standard- und Probenverdünnungen wurden in einer Menge von 50µl/ Vertiefung als Doppelbestimmung zugegeben:

3. Methoden

Standardverdünnungsreihe:

Der Standardantikörper ch14.18 (Anti- Disialoganglioside- GD2) wurde in Probenverdünnungspuffer auf 320 ng/ml, 160 ng/ml, 80 ng/ml, 40 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml und 2,5ng/ml verdünnt.

Probenverdünnungsreihe:

Die Patientenseren wurden gleichermaßen in Probenverdünnungspuffer auf 1:10, 1:100 und 1:500 und bei Bedarf nach zwei weiteren Verdünnungen auf 1:2500 und 1:12500 verdünnt.

Das Pipettieren des Standards und der Proben wurden in absteigender Konzentration in Doppelbestimmung aufgetragen.

Anschließend wurden die Platten 1h bei Raumtemperatur inkubiert, daraufhin 4 Mal mit Waschpuffer (II) gewaschen und ausgeklopft. Das Conjugat Goat- Anti-Human IgG wurde in einer Konzentration von 1:5000 in Probenverdünnungspuffer hergestellt und pro Vertiefung 100µl zupipettiert. Die Platten wurden erneut 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die MaxiSorp Nunc- Platten abgekippt, 3 Mal gewaschen und ausgeklopft. Die Substratlösung wurde in einer Menge von 50µl/ well zugegeben. Nach 5- 10 min in Dunkelheit wurde die Reaktion mit 50µl 2,5M Schwefelsäure gestoppt.

Die Messung erfolgte am Microplate Reader Milenia Kinetic Analyzer MKA200 bei einer Wellenlänge von 490 nm; die Referenzwellenlänge wurde auf 630nm gesetzt. Anhand der Standardverdünnungsreihe wurde eine Standardkurve errechnet. Zur Konzentrationsbestimmung der Patientenseren wurden diejenigen Verdünnungen herangezogen, deren Konzentrationen im logarithmischen Bereich der Standardkurven lagen. Die jeweiligen Konzentrationen wurden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert (Methoden 3.1.2.).

3. Methoden

3.2. Statistische Methoden

Für alle statistischen Auswertungen wurde das JMP 4.0 Programm benutzt.

3.2.1. Modellbeschreibung für die HACA- Bestimmung

Für die Beschreibung der Bildung der endogenen Antikörper gegen den murinen Anteil des therapeutisch verabreichten Antikörper ch14.18 wurde eine Kovarianzanalyse durchgeführt. Die Kovarianz zweier Variablen ist das Maß ihrer verbundenen (gemeinsamen) Verteilung. Die Kovarianzanalyse versucht den durch die Störvariable bedingten Effekt nachträglich statistisch auszugleichen, indem der auf die Kovariante zurückgehende Einfluß aus den Daten herausgerechnet wird. Als abhängige bzw. erklärte Variable benutzten wir die logarithmierten HACA Werte, die davor in Relativwerte umformatiert wurden. Die Logarithmierung wurde unternommen, um eine bessere Anpassung an eine Normalverteilung der Daten zu erreichen. Die unabhängigen bzw. erklärenden Variablen bestanden aus dem Detektionsantikörper, dem Zyklus, der Behandlungsgruppe, sowie aus dem Patient als zufälliger Effekt ohne Daten aus Zyklus 1. In diesem Modell geht der Zyklus als stetige Variable ein, d.h. es wird ein linearer Zykluseffekt modelliert.

3.2.2. Modellbeschreibungen für die Pharmakokinetik des ch14.18

Für die Halbwertszeit haben wir einen „non- linear- fit“ angewendet, mit der entsprechenden Modellgleichung $c=Ae^{-(k1)t}+ Be^{-(k2)t}$. An diese Gleichung wurden die validen Werte von dem Antikörper ch14.18 angepaßt. Die validen Werte waren das jeweilige Maximum der Zyklen und die darauffolgenden Werte des Zyklus, weil die Gleichung nur den Verlauf nach dem Maximum erklärt. Zyklen, die daraufhin weniger Beobachtungspunkte als Parameter, also weniger als vier valide Werte hatten, fielen weg. Daraufhin passten wir individuelle Kurven für

3. Methoden

jeden Patienten, in jedem Zyklus und sofern vorhanden jedem dokumentierten Tag an. Anschließend stellten wir die Kurven desselben Patienten zusammen in einem Diagramm dar und ermittelten die Halbwertszeitkonstanten „ k_1 “ und „ k_2 “. Als Randbedingung wurde „ $k_1 > k_2$ “ gesetzt. Aus den individuellen Parametern, speziell aus dem „ k_1 “ und „ k_2 “ haben wir mit den Gleichungen $t_{1/2a} = \ln 2 / k_1$ und $t_{1/2b} = \ln 2 / k_2$ die jeweiligen Halbwertszeiten errechnet. Schließlich wurde auch hier eine Varianzanalyse über die Parameter „ k_1 “ und „ k_2 “ durchgeführt. In dieser Varianzanalyse wurde untersucht, ob die beiden Werte „ k_1 “ und „ k_2 “ beeinflusst werden durch „Behandlungsgruppe“, „Zyklus“, „Behandlungstag“ und „Patient“. Die Einflussgrößen „Behandlungstag“ und „Patient“ als zufälliger Effekt waren genestet unter bzw. wurden getrennt nach der „Behandlungsgruppe“ analysiert. Bei der Beschreibung der „Baseline“, der Anfangswerte der jeweiligen Zyklen, und der Maximalwerte der erhobenen Kinetikdaten, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Die abhängige Variable bestand aus der „Baseline“ und der Maximalwerte. Und diese beiden Parameter wurden in Abhängigkeit von der „Behandlungsgruppe“, vom „Zyklus“ und vom „Behandlungstag“ genestet unter der „Behandlungsgruppe“ erklärt.

4. Ergebnisse

4.1. Entwicklung humaner Anti- Chimär- Antikörper (HACAs)

Es wurden insgesamt 55 Patienten aus der noch fortlaufenden Neuroblastomstudie NB97 auf die Generierung von endogenen Antikörpern (HACAs) gegen den therapeutischen Antikörper ch14.18 untersucht. Die Unterschiede des gesamten Patientenkollektivs liegen in der verabreichten Dosis und der Therapiezyklendauer. Die Gruppeneinteilung der 55 Patienten fand nach der unterschiedlichen Therapiezyklendauer statt: „5- Tage- “ versus „10- Tage- Behandlungsgruppe“.

Das Patientenkollektiv 1 mit 42 Patienten wurde mit 5 Tagen pro Zyklus und das Patientenkollektiv 2 mit 13 Patienten mit 10 Tagen pro Zyklus mit dem chimären Antikörper ch14.18 behandelt (siehe Abb.4).

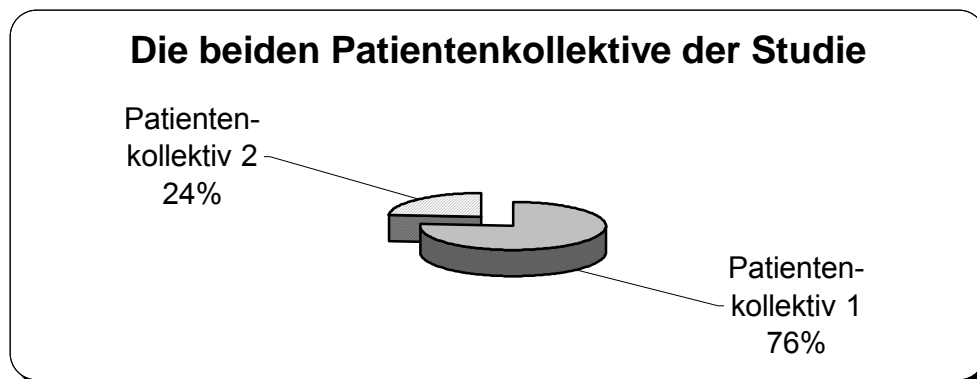


Abb.4: Verteilung der 2 Patientenkollektive auf das Gesamtkollektiv von 55 Patienten. 42 Patienten gehören dem Patientenkollektiv 1 („5- Tage- Behandlungsgruppe“) und 13 Patienten dem Patientenkollektiv 2 („10- Tage- Behandlungsgruppe“) an.

4. Ergebnisse

Ein weiterer Unterschied zwischen den Patienten aus den zwei Patientenkollektiven liegt unter anderem in der Anzahl ihrer maximalen Behandlungszyklen. Die Verteilung sieht folgendermaßen aus:

3 Patienten bekamen maximal 1 Zyklus, 9 Patienten wurden mit 2 Zyklen, 11 Patienten mit 3, 4 Patienten mit 4, 8 Patienten mit 5, 19 Patienten mit 6 und einer mit maximal 7 Zyklen behandelt (siehe Abb.5).

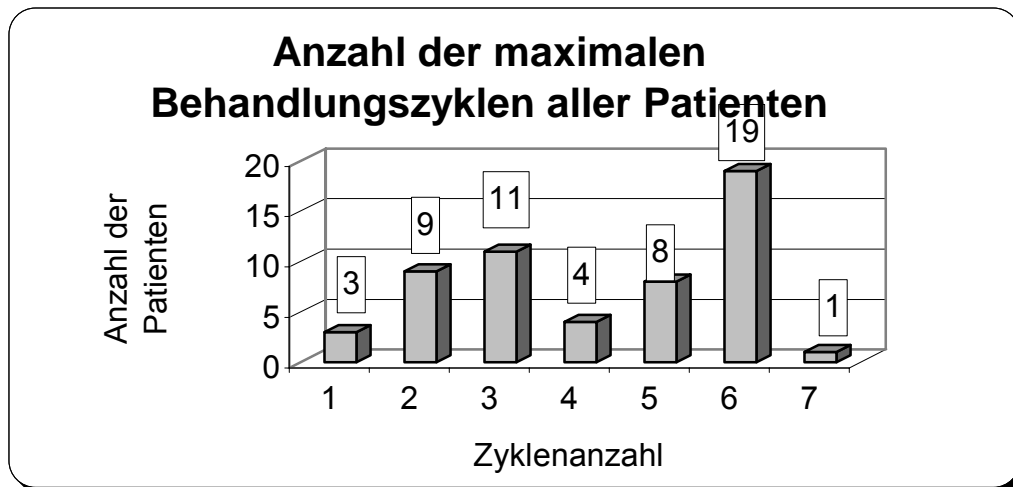


Abb.5: Die maximale Behandlungszyklenanzahl aller 55 Patienten.

Während der Untersuchung der vorhandenen Patientenserien wurden zwei verschiedene Detektionsantikörper (Detektionsantikörper 1 oder 2) für den ELISA-Assay verwendet. Die Benutzung von verschiedenen Detektionsantikörpern kam dadurch zustande, dass der Detektionsantikörper (2) während der Studie gewechselt wurde.

Innerhalb der zwei Patientenkollektive wurden bei 40 der 55 Patienten der Detektionsantikörper 1 und bei den restlichen 15 Patienten der 2. Detektionsantikörper verwendet (siehe Abb.6).

4. Ergebnisse

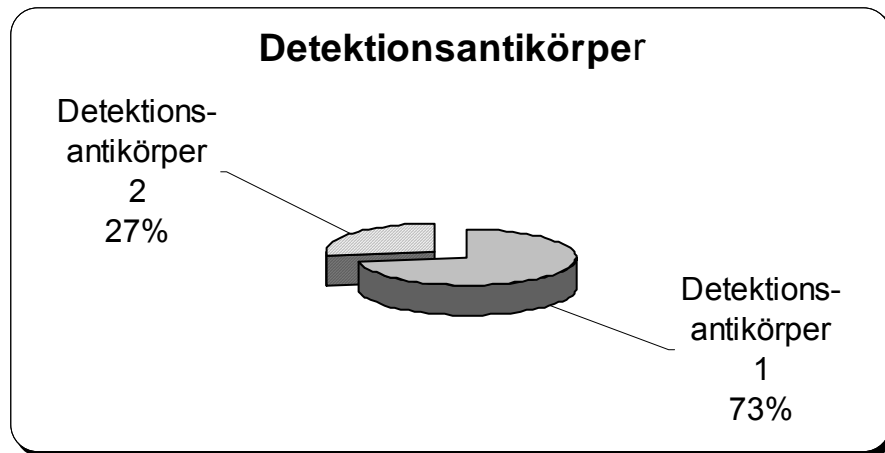


Abb.6: Verteilung der verschiedenen Detektionsantikörper 1 und 2 auf das Gesamtpatientenkollektiv von 55 Patienten.

Wenngleich beide Detektionsantikörper qualitativ sich gering unterscheiden, sind die quantitativen Unterschiede erheblich. Das betrifft vor allem negative Seren oder Seren mit niedrigen HACA- Werten, da ihre Nullwerte sich bedingt durch unterschiedliches „Rauschen“ voneinander unterscheiden. Um trotzdem die mit unterschiedlichen Meßsystemen erhobenen Daten vergleichen zu können, wurden Vergleiche mit Relativwerten („x- fachem Nullwert“) durchgeführt (siehe Tab.1 und 2 im Tabellenanhang). Die mit dem Detektionsantikörper (1) gemessenen Nullwerte weisen einen Durchschnittswert von ca. 2053 ng/ml (Patienten Nr.1- 27 und 43- 55) und die des Detektionsantikörpers (2) dagegen einen Durchschnittswert von ca. 49 ng/ml (Patienten Nr.28- 42).

4.1.1. Die Berechnung der HACA- Werte

Die HACA- Titer der Seren wurden unter Anwendung eines positiven Serums als Standard bestimmt. Dabei erfolgte die Quantifizierung zunächst in einheitslosen „units“ (u). Um Einsicht in die Absolutwerte (ng/ml) zu erlangen, wurden die

4. Ergebnisse

HACAs im Referenzserum quantifiziert. Dazu wurde ein weiterer ELISA- Assay angewandt (Methoden 3.1.2.).

Dieser Assay ermöglicht die Quantifizierung der IgG Menge in einer Lösung. Zunächst wurde der IgG- Gehalt einer affinitäts- chromatographisch- gereinigten HACA- Fraktion bestimmt; hier wurden 280 ng/ml anti- ch14.18 gemessen. Im Vergleich zu dem HACA- positiven Serum erreichte diese Fraktion einen Titer von 17,8u. Daraus folgte, dass ein unit 15,8 ng/ml ($=280/ 17,8$) HACA (IgG) entspricht. In den Tabellen sind die HACA- Werte sowohl als Absolutwerte in ng/ml als auch als Relativwerte wiedergegeben.

Die HACA- Werte des 1. und 2. Patientenkollektivs der Neuroblastomstudie NB97 sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt (siehe Tabellenanhang). Wie oben erwähnt, ist die NB97- Studie eine noch fortlaufende Studie, von der nur Patienten für diese Arbeit berücksichtigt wurden, die zum Zeitpunkt der Arbeit mindestens 4 Zyklen absolviert hatten.

Bei der Auflistung der relativen HACA- Werte aller Patienten nach steigendem HACA- Wert und der anschließenden Auswertung der Daten, kristallisieren sich innerhalb der 55 Patienten zwei große Gruppen heraus:

Die 1. Gruppe von 48 Patienten (87,3%), die betreffs der HACA- Bildung als negativ gezählt wurde („HACA- Negative“).

Und eine 2. Gruppe von 7 Patienten (12,7%), die im Vergleich zu der 1. Gruppe sehr hohe HACA- Werte („HACA- Positive“) bildeten (siehe Abb.7 und 8).

Der 2. Gruppe gehören die Patienten mit den Nummern 13, 25, 27, 31, 32, 35, 40 an, deren HACA- Werte während der Immuntherapie im Laufe der Zyklen kontinuierlich ansteigen, und mindestens das 90 fache des Anfangswertes am 1.Tag des 1.Zyklus annehmen. Diese Grenze wurde anhand der Betrachtung der

4. Ergebnisse

aufgelisteten Daten festgelegt. Diese Patienten gehören ausschließlich dem 1. Patientenkollektiv an.

Punkt = Gruppe 1 mit „HACA- negativen“ Werten

Kreuz = Gruppe 2 mit „HACA- positiven“ Werten

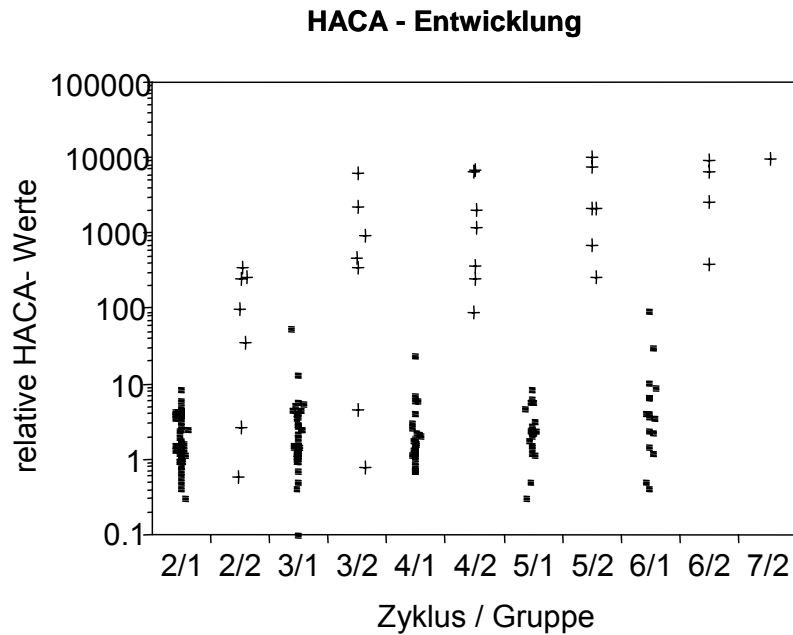


Abb.7: Die relativen HACA- Werte logarithmisch aufgetragen, getrennt nach den Gruppen 1 und 2. Dabei sieht man die Gruppe 2 von 7 Patienten, die im Gegensatz zu den übrigen Patienten eine HACA- Entwicklung zeigen.

4. Ergebnisse

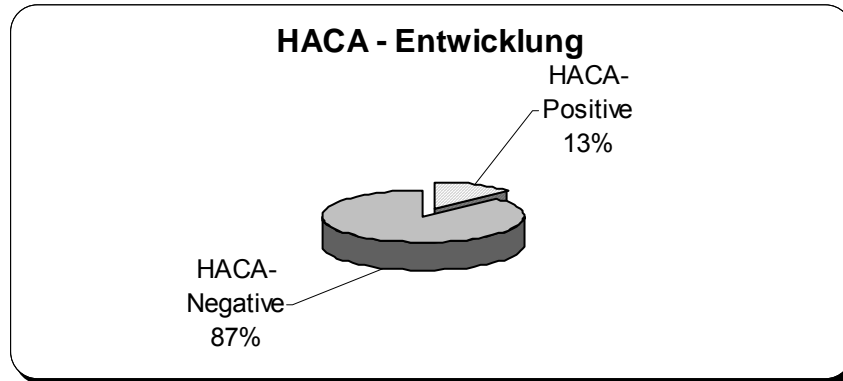


Abb.8: Verteilung der „HACA- positiven“ und „HACA- negativen“ Patienten aus allen Patientenkollektiven.

Von den 7 „HACA- positiven“ Patienten wurde Pat. 44 mit 4 Zyklen, Pat. 26 und Pat. 45 mit 5 Zyklen, Pat. 38, Pat. 48 und Pat.53 mit 6 Zyklen und Patient 40 mit 7 Zyklen behandelt, wobei diese Patienten am Ende aller Zyklen 380 bis 10 000 fach höhere Rohwerte annahmen, als die der„HACA- negativen“ Patienten (siehe Tab.3 und Abb.9).

Patient	13	25	27	31	32	35	40
Zyklus 1	1	1	1	1	1	1	1
Zyklus 2	2,7	0,6	100	260	250	350	36
Zyklus 3	4,65	0,8	480	940	2300	6300	350
Zyklus 4	250	90	6700	380	2100	6900	1200
Zyklus 5	690	260	10500		2120	7800	2200
Zyklus 6		390	3200			6750	2600
Zyklus 7			10000				

Tab.3: Die relativen Werte der „HACA- positiven“ Patienten während der Therapie

4. Ergebnisse

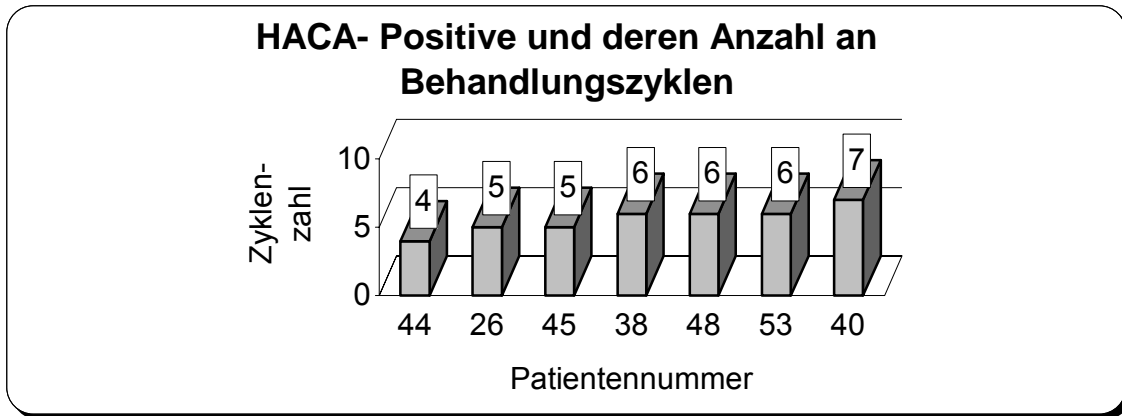


Abb.9: Die Anzahl an Behandlungszyklen der 7 „HACA- positiven“ Patienten aus der Neuroblastomstudie NB97.

Bei den 4 der obigen 7 Patienten sieht man schon ab dem 2. Zyklus eine HACA-Positivierung, bei einem ab dem 3. Zyklus und bei zwei Patienten erst ab dem 4. Zyklus (siehe Abb. 10).

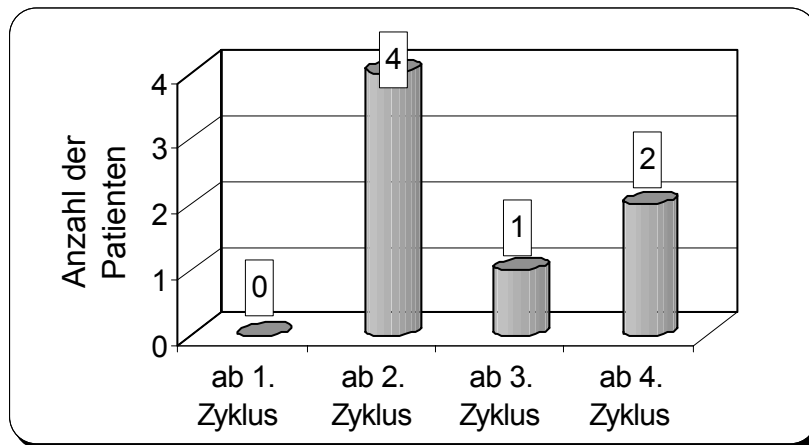


Abb.10: Beginn der zyklusabhängigen HACA- Positivierung.

4. Ergebnisse

Bei der Betrachtung der prozentualen Verteilung der „HACA- positiven“ von den „HACA- negativen“ am Gesamtkollektiv getrennt nach Zyklus, sieht man eine zyklusabhängige Vergrößerung des Anteils der Ersteren (siehe Tab.4). Folglich erkennt man eine Zunahme von „HACA- positiven“ Patienten im Laufe der Therapie.

Der zyklusabhängige Anteil „HACA- positiven“ Patienten

	„HACA- negative“	„HACA- positive“	Anzahl der Patienten
Zyklus 1	100 %	0 %	55
Zyklus 2	92,7 %	7,3 %	55
Zyklus 3	89,1 %	10,9 %	46
Zyklus 4	78,6 %	21,4 %	32
Zyklus 5	68,1 %	31,9 %	28
Zyklus 6	57,4 %	42,6 %	20
Zyklus 7	0 %	100 %	1

Tab.4: Prozentuale Verteilung der „HACA- positiven“ und „HACA- negativen“ am Gesamtkollektiv getrennt nach Zyklus. Je mehr Behandlungszyklen man verabreicht, desto mehr „HACA- positive“ Patienten kristallisieren sich heraus.

4. Ergebnisse

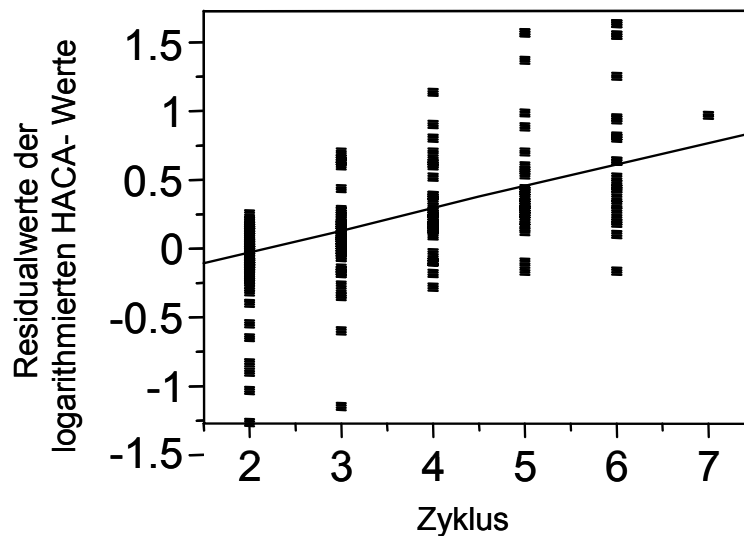
4.1.2. Einfluß der Zyklenzahl, Therapiezyklendauer, Antikörperdosis und die unterschiedliche Detektionsantikörperverwendung auf die HACA-Generierung

4.1.2.1. Einfluß der Anzahl der Behandlungszyklen auf die HACA- Bildung

Die Zyklanzahl hat einen Einfluß auf die Entwicklung humaner Anti- Chimär-Antikörper gegen den therapeutisch verabreichten Antikörper ch14.18. Das bedeutet, dass die Anzahl der Behandlungszyklen einen kumulativen Effekt auf die HACA- Generierung besitzt. Dies verdeutlicht eine Kovarianzanalyse (Methoden 3.3.1.), in die insgesamt 182 relevante Beobachtungen der Untersuchung eingingen.

Die Einflußgröße „Zyklus“ hat einen p- Wert von kleiner als 0,0001, woraus ersichtlich ist, dass der „Zyklus“ einen großen Einfluß auf die Bildung von HACAs besitzt. Mit Hilfe einer Residualanalyse der logarithmierten Werte, lässt sich ein linear wachsender Trend über die Zyklen beobachten (sieheAbb.11).

Reidualanalyse der gemessenen HACA- Werte



4. Ergebnisse

Abb.11: Linear wachsender Trend mit einem kumulativen Effekt über die Zyklen beim Auftragen der logarithmierten HACA- Relativwerte über die Zyklen. Der Residualwert des „Zyklus 2“ zeigt den Effekt des 1. Zyklus und die darauf folgenden Zyklen die Effekte all der vorigen Zyklen.

Der logarithmierte Effekt des „Zyklus“ auf die HACA- Bildung zeigt eine Gerade mit der Gleichung „log- Effekt(Zyklus) = 0,19 + 0,2 x Zyklus“ (Abb.12). Somit nehmen die logarithmierten Relativwerte absolut um den Wert 0,2 zu (siehe Tab.5).

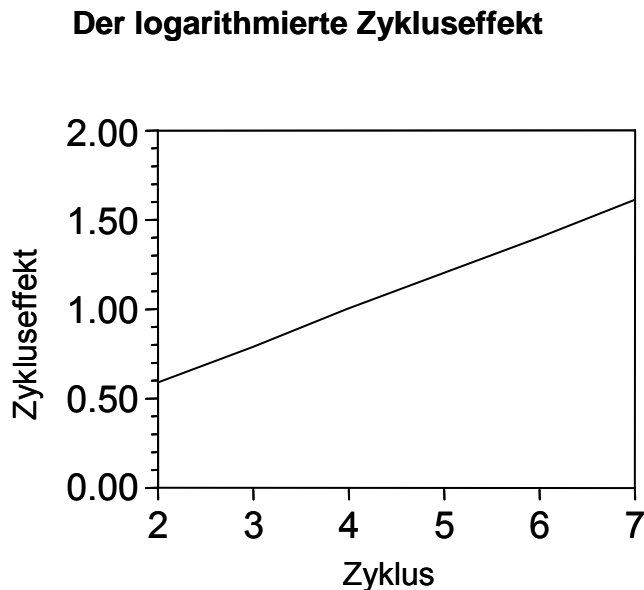


Abb.12: Logarithmierter Effekt des Zyklus auf die HACA- Generierung. Man sieht, dass im Laufe der Zyklen die logarithmierten Relativwerte absolut um den Wert 0,2 zunehmen.

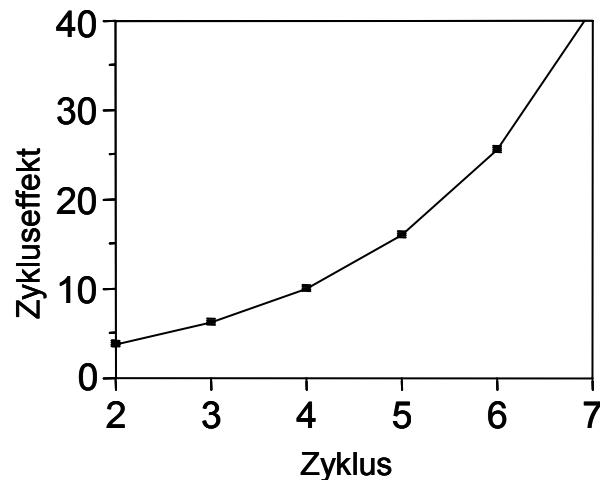
4. Ergebnisse

Zyklus	log-Effekt (Zyklus)
2	0.59
3	0.80
4	1.00
5	1.21
6	1.41
7	1.61

Tab.5: Der logarithmierte Zykluseffekt auf die HACA- Generierung

Bei den delogarithmierten Relativwerten sieht man beim Auftragen des Zykluseffektes auf die Behandlungszyklen einen exponentiellen Anstieg (siehe Abb.13). Die Relativwerte kumulieren um den Faktor 1,6 und entsprechend kumulieren die Absolutwerte im Ergebnisteil auch um denselben Faktor (siehe Tab.1 und 2 im Tabellenanhang, Tab. 6 und Abb.13).

Der delogarithmierte, bzw. tatsächliche Zykluseffekt



4. Ergebnisse

Abb.13: Der delogarithmierte Effekt der Zyklen auf die HACA- Generierung zeigt einen exponentiellen Anstieg mit Zunahme der Werte um den Faktor von 1,6.

Zyklus	Effekt (Zyklus)
2	3.92
3	6.28
4	10.04
5	16.05
6	25.68
7	41.07

Tab.6: Der Zykluseffekt auf die HACA- Generierung

4.1.2.2. Einfluß der Detektionsantikörper auf die Messergebnisse

Die Benutzung von zwei unterschiedlichen Detektionsantikörpern (1) und (2) (Material 2.1.3. und Ergebnis 4.1.1.) hat in Form eines Multiplikationsfaktors Einfluß auf die HACA- Messung und somit auch auf die Höhe der absoluten HACA- Werte. Die mit dem Detektionsantikörper (1) ermittelten Nullwerte sind im Durchschnitt um den Faktor 4,9 größer als die der mit dem Detektionsantikörper (2) gemessenen Nullwerte. In der obigen Kovarianzanalyse erzeugte die Variable „Detektionsantikörper“ einen niedrigen p- Wert von 0,2. Daraus ist ersichtlich, dass die Benutzung zweier unterschiedlicher Antikörper einen Einfluß auf die HACA- Werte hatte. Die relativen und somit auch die absoluten Werte des Detektionsantikörpers (1) sind um ca. den Faktor 4,4-mal höher als die des Antikörpers (2). (siehe Abb.14).

4. Ergebnisse

Einfluß unterschiedlicher Detektionsantikörper auf die HACA- Generierung

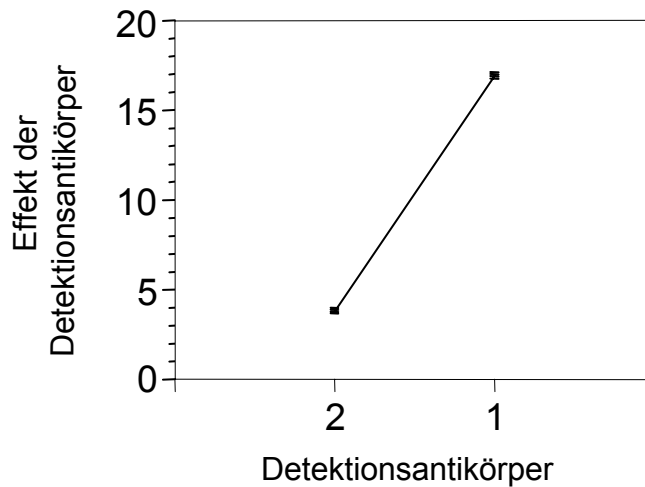


Abb.14: Einfluß der unterschiedlichen Detektionsantikörper auf die Messung der HACAs, wobei ersichtlich ist, dass alle HACA- Werte der Patienten gemessen mit Detektionsantikörper (1) um den Faktor 4,4 höher sind, als die mit dem anderen Detektionsantikörper (2) gemessenen Werte.

4.1.2.3. Einfluß der Dauer der Therapiezyklen auf die HACA- Bildung

Innerhalb der Patientenkollektive 1 und 2 gibt es, wie bereits erwähnt, einen Unterschied bei den behandelten Tagen pro Zyklus. 42 (Patientenkollektiv 1) von den 55 Patienten wurden mit 5 Tagen pro Zyklus und die restlichen 13 (Patientenkollektiv 2) mit 10 Tagen pro Zyklus behandelt. Beim Mittel über alle Zyklen und alle Patienten, die jeweils in diesem Patientenkollektiv sich befinden, zeigt sich bei einem p- Wert von 0,57 kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientenkollektiven. Bei den mit 10 Tagen behandelten Patienten sind die relativen HACA- Werte im Schnitt um den Faktor 1,64 höher als die HACA- Werte

4. Ergebnisse

der „5- Tage- Gruppe“. Dementsprechend verhalten sich auch die Absolutwerte aller Patienten (siehe Abb.15).

Einfluß der unterschiedlichen Therapiezyklendauer auf die HACA-Generierung

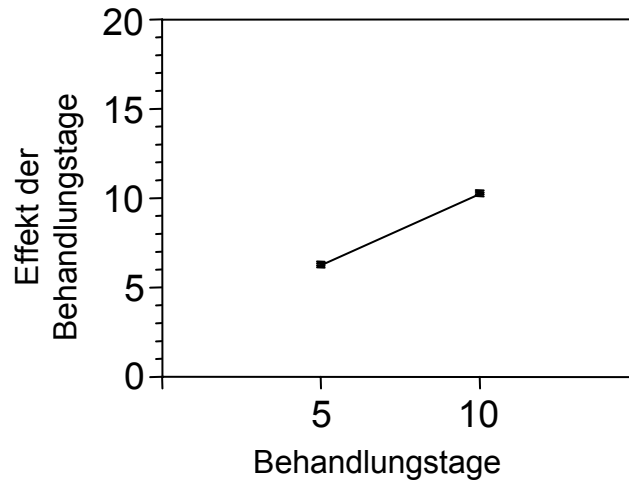


Abb.15: Effekt der unterschiedlichen Behandlungsgruppen auf die HACA-Generierung. Die Werte der „10- Tage- Gruppe“ ist um den Faktor 1,64 höher, als die Werte der „5- Tage- Gruppe“.

4.1.2.4. Unterschiede in der HACA- Bildung bei unterschiedlicher Dosisverabreichung (zwischen Patientenkollektiv 1 und 2)

Die unterschiedlichen Behandlungsprotokolle und der daraus resultierende Unterschied der Dosis zwischen Patientenkollektiv 1 und 2 haben so gut wie keinen Einfluß auf die HACA- Bildung als Reaktion der Patienten auf den therapeutisch verabreichten ch14.18.

4. Ergebnisse

Es wurde erneut ein Varianztest (Methoden 3.3.1.) durchgeführt, um den Einfluß der Dosisänderung auf die Bildung der Antikörper im Laufe der Behandlung zu untersuchen. Bei einem p von 0,69 sieht man aber, dass die unterschiedliche Dosis der Patientenkollektive keinen signifikanten Effekt auf die HACA-Generierung hat. Wie in der Abbildung 16 ersichtlich, sieht man, dass die relativen HACA- Werte des Patientenkollektivs 2 um den Faktor 1,1 höher sind als die Werte des 1. Patientenkollektivs.

Unterschiede in der HACA- Bildung zwischen den Patientenkollektiven 1 und 2

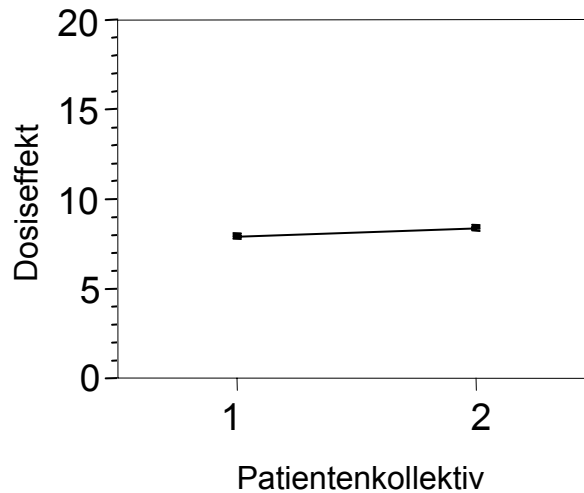


Abb.16: Der Einfluß der unterschiedlichen Dosis auf die HACA- Generierung. Die HACA- Werte des Patientenkollektivs 2 sind um den Faktor 1,1 größer als die Werte der Patientenkollektivs 1.

4. Ergebnisse

4.2. Pharmakokinetik des therapeutischen Ak ch14.18

Die Abnahme von Seren zur Bestimmung der Pharmakokinetik wurde nicht von allen Patienten der Neuroblastomstudie NB97 vorgenommen. Zur Bestimmung der Pharmakokinetik des chimären Antikörpers wurden nur Seren von nur 22 Patienten in 1 bis 3 Zyklen herangezogen. Hierfür wurde die Konzentration des Antikörpers im Serum jeweils am ersten und letzten Infusionstag des Zyklus bestimmt. Die Seren wurden 6 Stunden vor der Infusion („-6“), unmittelbar nach dem Infusionsende (Stunde 0) und eine halbe, eine, zwei, sechs und 16 Stunden später abgenommen. Als Nullwerte oder „Baseline“ wurden die „6 Stunden vor der Infusion“- Werte festgelegt, um damit die Relativwerte berechnen zu können.

Diese 22 Patienten hatten innerhalb der Therapie unterschiedliche Zyklendauer. 9 der 22 Patienten (41%), wurden mit 5 Tagen pro Zyklus („5-Tage- Behandlungsgruppe“) und 13 Patienten (59%) mit 10 Tagen pro Zyklus („10- Tage- Behandlungsgruppe“) therapiert (siehe Abb.17).

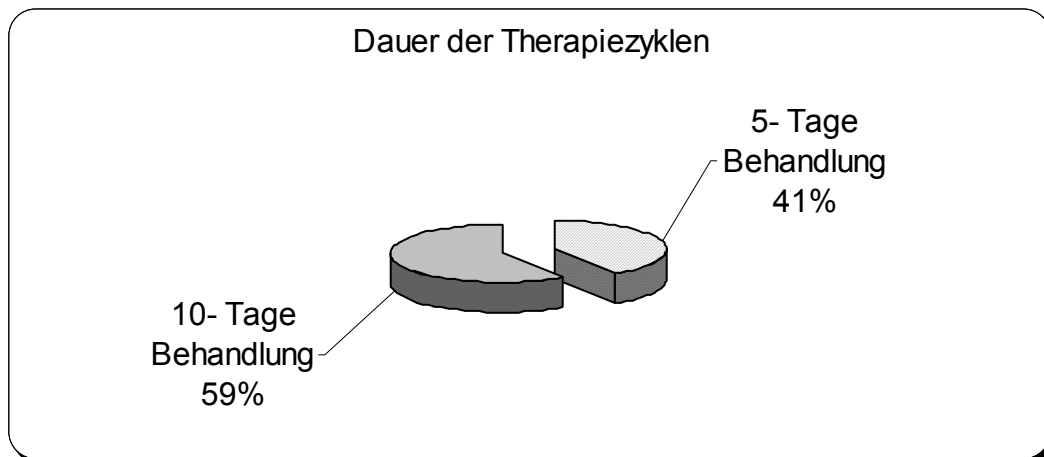


Abb.17: Verteilung der 22 Patienten des Patientenkollektivs 1 und 2 nach Anzahl der Tage der Behandlungszyklen.

4. Ergebnisse

Die Bestimmung der Menge des Serumtiters des therapeutischen Antikörpers ch14.18 erfolgte mittels ELISA- Technik (Methodik 3.1.3.1.).

Die ermittelten Absolut- und Relativwerte des therapeutischen Antikörpers ch14.18 der „5- Tage- Behandlungsgruppe“ in ng/ml und als x- facher Nullwert sind in Tab. 7 im Tabellenanhang getrennt nach Zyklus 1, 2 und 3 wiedergegeben und die Absolut- und Relativwerte der „10- Tage- Behandlungsgruppe“ in Tab. 8 im Tabellenanhang. Leere Felder in den Tabellen kamen zustande, weil für die Patienten oder für die Zeitpunkte keine Seren zur Verfügung standen.

4.2.1. Vergleich der Nullwerte innerhalb der beiden Behandlungsgruppen

Betrachtet man die „Baseline“, also die Nullwerte und führt mit den Werten eine Varianzanalyse durch, liefert die Einflussgröße Behandlungsgruppe einen p-Wert von $< 0,001$. Dieser Wert spricht für einen Zusammenhang zwischen dem Parameter „Baseline“ und der Behandlungsgruppe.

Die erhobenen Daten zeigen, dass sich die Nullwerte am ersten und letzten Tag der Zyklen innerhalb der zwei Behandlungsgruppen unterscheiden (siehe Abb.18 und Abb.19).

Man sieht eine Akkumulation des Antikörpers ch14.18 am Ende aller Zyklen bei beiden Gruppen, jedoch unterscheiden sich die Werte der beiden Vergleichsgruppen (siehe Abb.18 und Abb.19).

4. Ergebnisse

Die „5- Tage- Behandlungsgruppe“, also die mit fünf Tagen pro Zyklus behandelten 9 Patienten haben am Ende aller 3 Zyklen einen im Durchschnitt um 44 fach höheren „Baseline“- Wert als am Anfang aller Zyklen (siehe Abb.18).

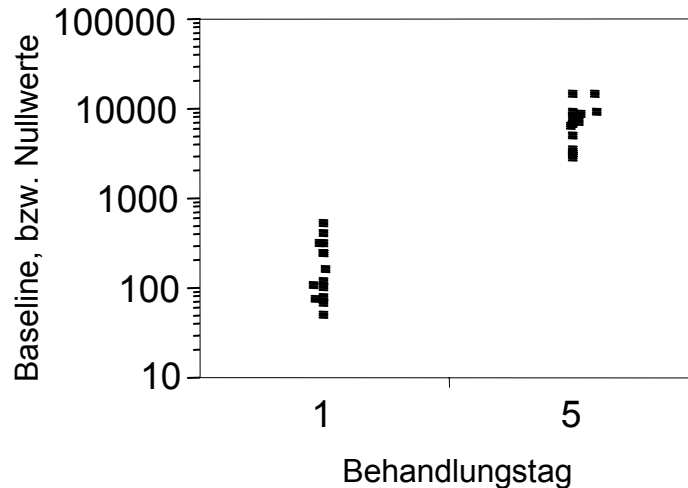


Abb.18: Absolute „Baseline“- Werte der „5- Tage- Behandlungsgruppe“. Die Nullwerte sind am Ende der Zyklen, also am 5.Tag um den Faktor 44 erhöht.

Wie in Abbildung 19 ersichtlich, zeigen die „Baseline- Werte“ der „10-Tage- Behandlungsgruppe“ einen gleichen Effekt. Hier liegen die „Baseline“- Werte am letzten Tag der Zyklen ebenfalls höher als an den ersten Tagen aller Zyklen. Und zwar um den Faktor 6,8.

4. Ergebnisse

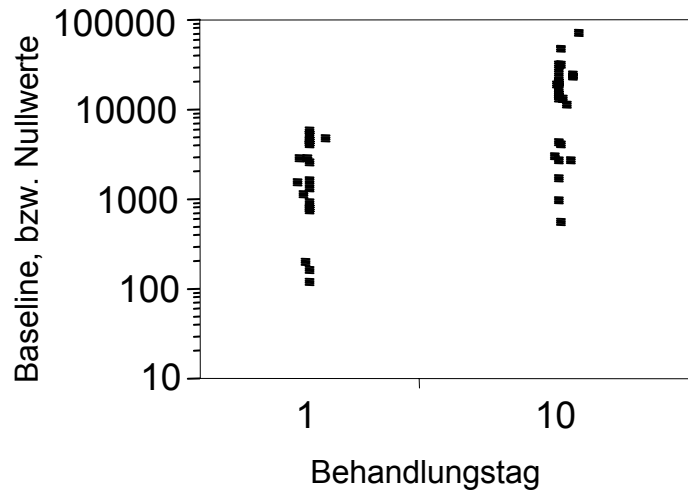


Abb.19: Absolute „Baseline“- Werte der „10- Tage- Behandlungsgruppe“. Die Nullwerte am Ende des Behandlungszyklus sind um den Faktor 6,8 höher als am Anfang, wobei die Werte am Ende der Zyklen im Gegensatz zu der „5- Tage- Behandlungsgruppe“ auch mehr streuen.

4.2.2. Vergleich der Nullwerte zwischen den beiden Behandlungsgruppen

Nun wird untersucht, ob die „Baseline“- Werte zwischen den beiden Behandlungsgruppen am ersten und letzten Tag der Behandlungszyklen einen Unterschied zeigen. Hierzu führte man eine Varianzanalyse durch.

Der p-Wert der Einflussgröße „Behandlungstag“ innerhalb der Behandlungsgruppen ist $< 0,001$ und zeigt somit einen sehr großen Effekt auf die „Baseline“. In der zweiten Gruppe, also der „10-Tage-Behandlungsgruppe“ sind die Nullwerte am ersten Tag aller Zyklen um den Faktor 9,3 höher als die Nullwerte der ersten Gruppe, also der „5-Tage-Behandlungsgruppe“ (siehe Abb. 20).

4. Ergebnisse

Behandlungsgruppe 1 = 5-Tage- Gruppe

Behandlungsgruppe 2 = 10-Tage- Gruppe

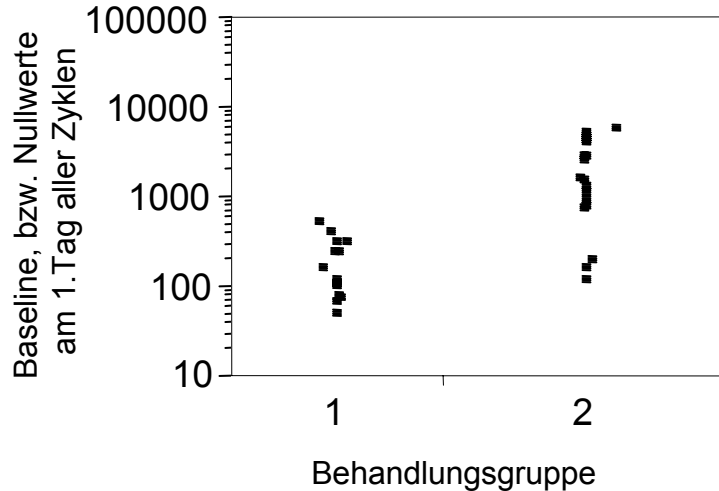


Abb.20: Absolute „Baseline“-Werte der beiden Behandlungsgruppen am 1.Tag aller Zyklen. Die Nullwerte der „10-Tage-Behandlungsgruppe“ sind am 1.Tag der Zyklen um den Faktor 9,3 höher als die der „5-Tage-Behandlungsgruppe“.

Auch am letzten Tag der Zyklen unterscheiden sich die Behandlungsgruppen hinsichtlich der „Baseline“-Werte. In der „10-Tage-Behandlungsgruppe“ scheinen die Werte in der Abbildung 21 zum Größtenteils höher zu sein als die Werte der „5-Tage-Behandlungsgruppe“; und zwar im Schnitt um den Faktor 1,4. Die Werte in der zweiten Gruppe streuen aber zu sehr, somit ist der Einfluss der unterschiedlichen Behandlungsgruppe am letzten Behandlungstag aller Zyklen nicht so ausgeprägt wie am ersten Tag.

4. Ergebnisse

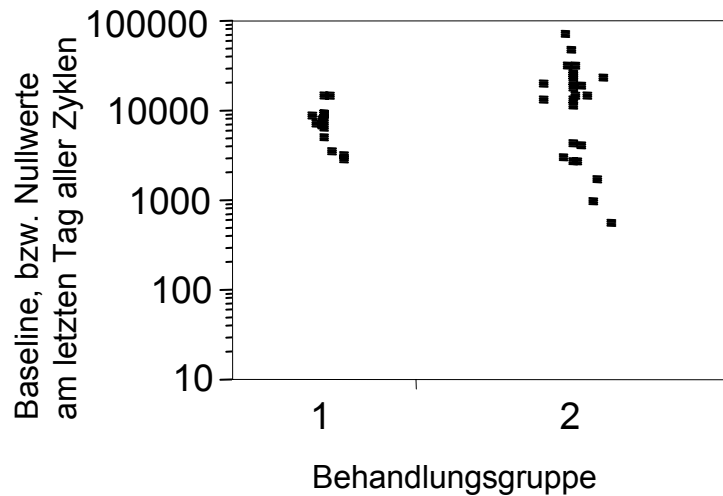


Abb.21: Absolute „Baseline“ -Werte der beiden Behandlungsgruppen am letzten Tag aller Zyklen. Die Nullwerte der „10-Tage-Behandlungsgruppe“ sind am letzten Tag der Zyklen um den Faktor 1,4 höher als die der „5-Tage-Behandlungsgruppe“.

Die „5- Tage- Behandlungsgruppe“ zeigt eine deutlich höhere Antikörperakkumulation als die „10- Tage- Behandlungsgruppe“, weil sie an den ersten Tagen der Zyklen weitaus niedrigere Werte hatte und im Laufe der Therapie am letzten Tag der Zyklen fast genauso hohe Werte annahm (siehe Abb.20 und 21). Dies bekräftigt auch eine weitere Varianzanalyse (siehe Methodik 3.3.2.).

4.2.3.Vergleich der Maximalwerte beider Behandlungsgruppen

Die Maximalwerte der „10-Tage-Behandlungsgruppe“ weisen im Vergleich zur „5-Tage-Behandlungsgruppe“ höhere Konzentrationen auf. Zugleich sind bei beiden Behandlungsgruppen die Maximalwerte am letzten Behandlungstag der Zyklen höher als am ersten Behandlungstag der Zyklen.

In Abbildung 22 sind die anhand der Rohdaten ermittelten Maximalwerte getrennt nach Behandlungsgruppe und Behandlungstag aufgetragen. Tabelle 9 beinhaltet

4. Ergebnisse

den geometrischen Mittel und den oberen und unteren Wert des Streubereiches, wiederum gesplittet nach Behandlungsgruppe und Behandlungstag.

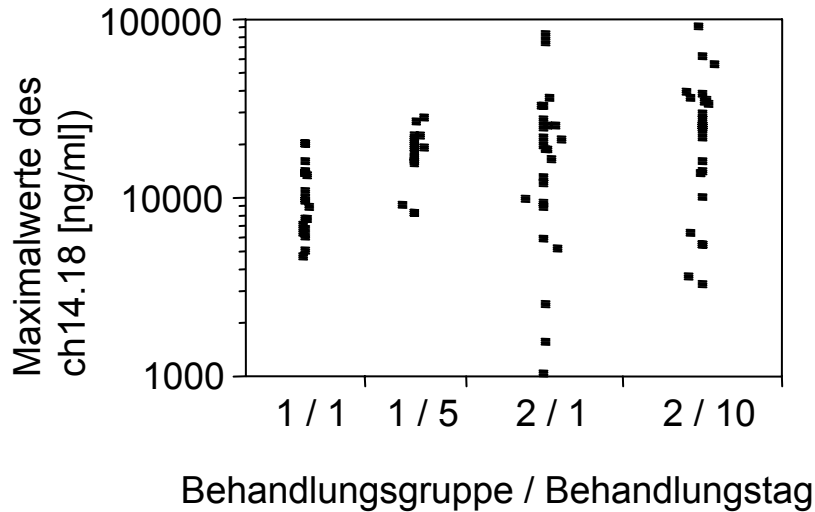


Abb.22: Die Maximalwerte in ng/ml am Anfang und am Ende der Zyklen aufgeteilt nach den beiden Behandlungsgruppen.

Behandlungsgruppe/ Tag	unterer Wert des Streubereiches	geometrischer Mittel	oberer Wert des Streubereiches
1/1	6025	9550	15136
1/5	11482	16596	23988
2/1	4677	14125	42658
2/10	7762	19953	51286

Tab.9: Der geometrische Mittel und der obere und untere Wert des Streubereiches der Maximalwerte des therapeutischen Antikörpers ch14.18 in ng/ml innerhalb der ersten und letzten Tage aller Zyklen.

4. Ergebnisse

Wenn man die Verläufe und die erreichten Konzentrationen während eines Zyklus betrachtet, stellt sich heraus, dass der Verlauf der Konzentration während der Verteilung und Elimination in zwei Abschnitte eingeteilt werden kann: Eine erste Phase, während der eine rasche Konzentrationsabnahme des Antikörpers im Serum erfolgt, und eine zweite Phase mit langsamerer Abnahme der Konzentration. Deshalb wurde für die Berechnung der pharmakokinetischen Daten ein „Zwei- Kompartimenten- Modell“ mit der Gleichung $c=Ae^{-(k_1)t}+ Be^{-(k_2)t}$ angenommen. In Tabelle 10 sind die Eliminationskonstanten „ k_1 “ und „ k_2 “, als auch die errechneten Halbwertszeiten als Median und 10. bzw. 90. Percentil angegeben. Die Werte zwischen den beiden Percentilen beinhalten 80% der gemessenen Daten. Die Halbwertszeiten errechnen sich nach der Formel $(\ln 2) / k_{1/2}$. Somit bewegen sich 80% der errechneten Halbwertszeiten der Patienten zwischen 11h und 117h mit einem Mittelwert von 37h.

	k_1	k_2	$a= t_{1/2a}$	$b= t_{1/2b}$	$H= a+ b$
90% Quantil	2,69	0,07	15,6 min	9,9 h	10 h
Median	1,69	0,019	24,6 min	37 h	37 h
10% Quantil	0,61	0,006	68,2 min	115,5 h	117 h

Tab.10: Die errechneten Percentile und Mediane der Parameter. Gesamthalbwertszeit (H) entspricht der Summe der Halbwertszeiten der schnellen ($a= t_{1/2a}$) und der langsameren Elimination ($b= t_{1/2b}$).

Es wurde untersucht, ob die zwei Behandlungsgruppen, die Zyklenanzahl oder die Behandlungstage die Halbwertszeit und somit die Elimination des ch14.18 beeinflussen.

4. Ergebnisse

Hierzu wurde eine Varianzanalyse durchgeführt, wobei die Einflussgrößen „Behandlungsgruppe“, „Zyklus“, „Tag“ und „Patient“ in Bezug auf den Parameter „ k_1 “ und „ k_2 “ untersucht wurden. Die Größe „Behandlungsgruppe“ bezieht sich dabei auf die unterschiedlichen Längen der Zyklen. Die ersten neun Patienten wurden mit 5 Tagen (Gruppe 1) und die restlichen 13 mit 10 Tagen (Gruppe 2) pro Zyklus behandelt.

4.2.4. Einfluss der Zyklenzahl auf die Pharmakokinetik des Ak ch14.18

Der „Zyklus“ wurde auch in die Analyse mit eingenommen, da die Patienten mit unterschiedlicher Anzahl an Zyklen behandelt wurden. Von den 22 Patienten, wurden von 10 Patienten Seren von 3 Zyklen, von 9 Patienten Seren von 2 Zyklen und von 3 Patienten Seren von einem Zyklus abgenommen (siehe Abb.23).

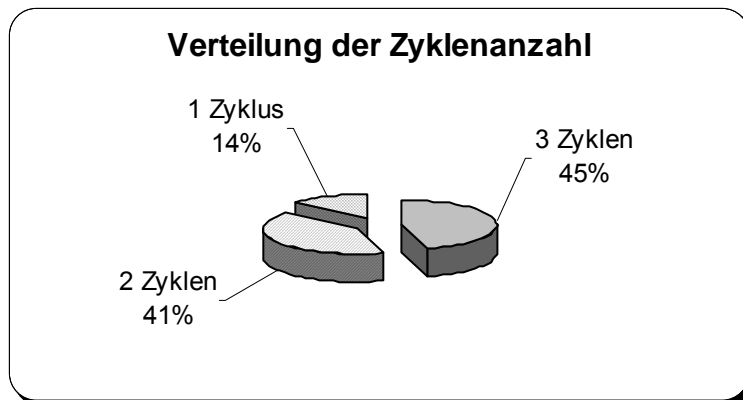


Abb.23: Die Anzahl an Behandlungszyklen der 22 Patienten, von denen auch Seren zur Untersuchung der Pharmakokinetik abgenommen wurden.

Die Erhöhung der Zyklenzahl führt zu einer Erniedrigung der b - Halbwertszeit ($t_{1/2b}$) und somit zu einer Beschleunigung der Endphase der langsamen Elimination.

4. Ergebnisse

Betrachtet man die p-Werte der durchgeführten Varianzanalyse, hat der Zyklus mit einem p-Wert von 0,003 einen signifikanten Einfluss auf die Verteilungskonstante „ k_2 “. Wenn man die Mittelwerte der „ k_2 “-Werte von den jeweiligen Zyklen in einem Diagramm (siehe Abb.24) aufträgt, sieht man eine Erhöhung der „ k_2 “-Werte im Laufe der Zyklen. Von Zyklus 1 zu Zyklus 2 steigt der „ k_2 “-Wert um den Faktor 1,21, und vom zweiten zum dritten Zyklus um den Faktor 1,31.

Der faktorielle Einfluss der Zykluserhöhung auf den „ k_2 “ Wert

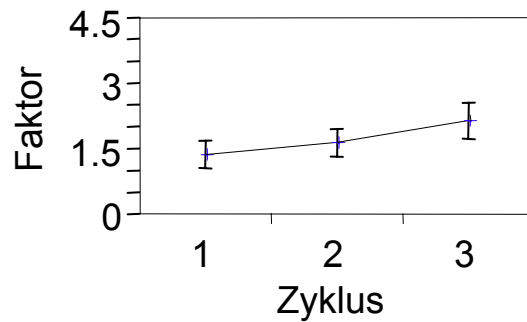


Abb.24: Der Zyklußeffect auf den „ k_2 “-Wert besteht darin, dass der „ k_2 “ im Laufe der Zyklenzahl um den Faktor 1,21 und 1,31 steigt, was eine Erniedrigung der Halbwertszeit bedeutet.

Dass die Anzahl der Zyklen im Gegensatz zum Parameter „ k_2 “ keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilungskonstante „ k_1 “ hat, sieht man an dem p-Wert von 0,6 der Varianzanalyse. Im Laufe der Zyklen ändert sich nichts an der Größe des „ k_1 “-Wertes, vom zweiten zum letzten Zyklus fällt er jedoch allenfalls um den Faktor 1,01 (siehe Abb.25).

4. Ergebnisse

Der faktorielle Einfluss der Zykluserhöhung auf den „ k_1 “ Wert

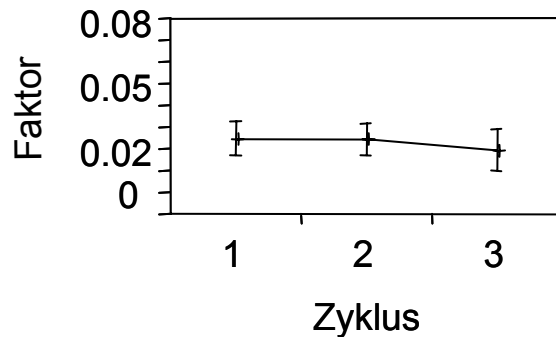


Abb.25: Der Zykluseffekt auf den „ k_1 - Wert“ zeigt keine Veränderung der Halbwertszeit der zweiten Eliminationsphase im Laufe der Zyklen.

4.2.5. Einfluss der Behandlungsgruppe auf die Pharmakokinetik des Akch14.18

Bei der „5-Tage-Behandlungsgruppe“ ist die zweite Phase der Elimination des therapeutisch verabreichten Antikörpers schneller als die der „10-Tage-Behandlungsgruppe“.

Diese Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe zeigt die Varianzanalyse des Parameters „ k_2 “ mit einem p-Wert von 0,016. Die Abbildung 26 zeigt den Einfluss der Behandlungsgruppe auf die Eliminationskonstante „ k_2 “. Bei der „5-Tage-Behandlungsgruppe“ findet sich ein um den Faktor 1,03 erhöhter „ k_2 “-Wert.

4. Ergebnisse

Der Vergleich der Behandlungsgruppen im Bezug auf den „ k_2 “ Wert

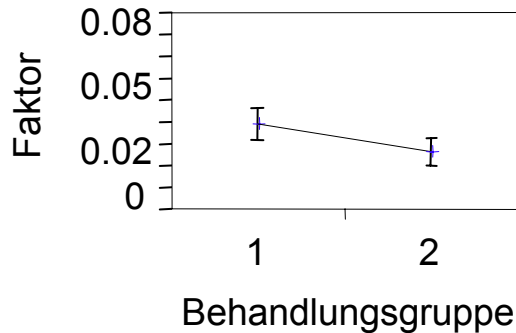


Abb.26: Der Gruppeneffekt auf den „ k_2 - Wert“ zeigt, dass die Behandlungsgruppe 1 („5-Tage-Behandlungsgruppe“) im Vergleich zu der Gruppe 2 eine schnellere Elimination in der zweiten Phase der Elimination aufzeigt.

4.2.6. Einfluss der HACA- Bildung auf die Pharmakokinetik des Ak ch14.18

In dem Patientenkollektiv der „HACA- positiven“ Patienten 13, 25, 27, 31, 32, 35, 40 (Ergebnisse 4.1.1.) wurde eine Abnahme von Seren zur Pharmakokinetikbestimmung durchgeführt. Somit liegen uns von diesen Patienten keine Pharmakokinetikwerte vor, womit wir den Einfluß des Antikörpers ch14.18 auf die Bildung von humanen anti- chimär Antikörpern hätten untersuchen können.

5. Diskussion

Neuroblastomerkrankungen in fortgeschrittenem Stadium gehören immer noch zu den Sorgenkindern der pädiatrischen Onkologie. Mit den bisher zur Verfügung stehenden Mitteln sind die Heilungsaussichten für Patienten, die aufgrund von Tumorausbreitung und –merkmalen in die Hochrisikogruppe eingestuft werden, trotz intensivster Therapie nicht zufriedenstellend, und es muss mit einer hohen Rezidivrate gerechnet werden.

Deshalb erscheint es besonders wichtig, die Erforschung neuer Behandlungsansätze auf diesem Gebiet voranzutreiben. Die Möglichkeiten der Immuntherapie bilden hier einen klinischen Forschungsschwerpunkt. Mancher vielversprechende Ansatz muss wegen unerwarteter Nebeneffekte wieder verlassen werden oder modifiziert werden, bis eine breitere therapeutische Anwendung in klinischen Studien möglich wird. Die Antikörpertherapie im Rahmen der Neuroblastomstudie NB97 ist ein Beispiel dafür, dass der Antikörper ch14.18 in der Behandlung von Risikopatienten neue Wege eröffnet und Hoffnungen weckt. Unser gesamtes Patientenkollektiv bestehen aus Patienten dieser Studie. Da die Studie noch nicht abgeschlossen ist, können wir vorerst nur von Zwischenergebnissen berichten.

Im Folgenden sollen zunächst die Methodik und anschließend die Ergebnisse der in vitro Experimente diskutiert werden. Zum Abschluss werden die Schwierigkeiten der Krebstherapie und eine Vorschau auf Perspektiven bei der Behandlung des Neuroblastoms dargestellt.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methoden

5.1.1. Konzentration des chimären Antikörpers im Serum

Einleitend Allgemeines zum ELISA- Assay, der hauptsächlich in dieser Arbeit verwendet wurde. Der Assay kann geringe Mengen einer spezifischen Substanz nachweisen und quantifizieren; d.h. er ist grundsätzlich spezifisch. Die Hauptproblematik hierbei sind jedoch unspezifische Wechselwirkungen mit komplexen Gemischen, wie in unserem Fall mit Seren. Denn es besteht die Möglichkeit, dass während der Messungen ein Bestandteil des tiefgefroren aufbewahrten Serums unspezifisch mit den Reagenzien des ELISAs kreuzreagiert, so wie es bei uns der Fall war.

Ein Beispiel hierzu wäre, dass die beiden angewandten Antikörper keinen Background bei BSA- Lösungen machen, bei Seren dagegen schon. Die vorhandenen Wechselwirkungen mit Serumkomponenten führen daher zu falsch positiven Ergebnissen. Dieser Effekt wird nochmals verstärkt, wenn aufgrund eines geringen Messfensters starke Verdünnungen durchgeführt werden müssen. Somit erreichte der mit dem Umrechnungsfaktor umgerechnete tatsächliche Wert einer 250 fachen Verdünnung einen geringeren Absolutwert als einer 1000 fachen Verdünnung (im Falle, dass beide Verdünnungen im Messfenster liegen).

Die in dieser Arbeit benutzten ELISAs waren allesamt nicht kommerziell erhältlich. Eine hohe Ungenauigkeit kann von daher akzeptiert werden. Die Entwicklung hochspezifischer Techniken erfordert neben vielen Versuchsreihen auch den Aufwand verschiedener Substanzen und Antikörper, was gerade im letzten Fall einen hohen finanziellen Aufwand bedeutet.

In der Schlussfolgerung sollte man erwähnen, dass aufgrund von Fehlerraten die ermittelten Serumkonzentrationen nicht unbedingt der Realität entsprechen. Bei einer IgG- Serumkonzentration von 2 mg/ml macht die maximal gemessene

5. Diskussion

HACA- Konzentration von 1,1 mg/ml bei einer 62500 fachen Verdünnung etwa 55 % aus. Und diese gemessene Menge ist zu hoch.

Viele Anstrengungen wurden gemacht, HACAs zu quantifizieren (28, 107, 189). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten ELISA war es möglich die Menge an HACAs zu quantifizieren, aber nur der relative Vergleich innerhalb und zwischen den Patienten schien wie oben erwähnt sinnvoll, denn in diesen Berechnungen müssen die oben erwähnten Überlegungen berücksichtigt werden. Aus diesem Grund ziehen wir vor, die HACA- Generierung zu dokumentieren und die Ergebnisse als Relativwerte direkt zu vergleichen.

5.1.2. Humane Anti- Chimär- Antikörper

Bei der Betrachtung der Nullwerte für den chimären Antikörper erkennt man zwei Gruppen. Die Spiegel der einen Gruppe sind insgesamt höher als die der anderen Gruppe. Wie aus den Tabellen 1 und 2 ersichtlich, weist die Benutzung von zwei verschiedenen Detektionsantikörpern einen quantitativen Unterschied im Bezug auf die Nullwerte („Baseline“) auf. Die mit dem ersten Detektionsantikörper gemessenen Nullwerte weisen einen hohen Durchschnittswert von ca. 2053 ng/ml (Patienten Nr.1- 27 und 43- 55) auf, die des zweiten Detektionsantikörpers dagegen einen viel niedrigeren Durchschnittswert von ca. 49 ng/ml (Patienten Nr.28- 42).

5. Diskussion

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Pharmakokinetik des Antikörpers ch14.18

In dieser Arbeit haben wir das Gesamtkollektiv von 55 Patienten aufgrund der Unterschiede in der Zyklendauer in zwei Patientenkollektive geteilt. 76% gehören dem 1. Patientenkollektiv, also der „5-Tage-Behandlungsgruppe“ und 24% dem 2. Patientenkollektiv, also der „10-Tage-Behandlungsgruppe“ an.

Für die Messung der Antikörperspiegel standen von dem Gesamtkollektiv von 55 Patienten Seren von 22 Patienten zur Verfügung, die unterschiedlich behandelt worden sind. Betrachtet man die Konzentrationen des chimären Antikörpers an allen Infusionstagen, beobachtet man bei allen Patienten eine biphasische Abnahme der Konzentration des Antikörpers. Dies entspricht einem **Zwei-Kompartimentmodell**.

Dieses Modell beinhaltet, dass sich der Antikörper einem Diffusionsgefälle folgend aus dem intravaskulären Raum in das extravaskuläre, tiefere Kompartiment verteilt. Diese Verteilung hat eine schnelle Konzentrationsabnahme im Serum zur Folge, bis sich schließlich ein Gleichgewicht zwischen den intra- und extravaskulären Kompartimenten eingestellt hat. Man nennt diese erste Phase deshalb auch Verteilungsphase.

In der darauffolgenden Eliminationsphase erfolgt die Metabolisierung des Pharmakons. Dem neuen Konzentrationsgefälle folgend diffundiert die in den tiefen Kompartimenten befindliche Menge in das intravaskuläre Kompartiment zurück, wo die Metabolisierung stattfindet (55).

Betrachtet man zunächst die Maximalwerte im Serum nach der Verabreichung des Antikörpers ch14.18, haben wir gemäß dem Zwei-Kompartimentmodell einen maximalen Anstieg des Antikörpers in der Zeit zwischen der Verabreichung ($t=0$) und einer halben Stunde ($t=0,5$) nach dessen Applikation. Eine detaillierte Analyse der Pharmakokinetik des monoklonalen anti-Gangliosid (GD2) Antikörpers

5. Diskussion

ch14.18 bei unserem Patientengut von Kindern mit refraktärem Neuroblastom zeigt maximale Serumkonzentrationen des ch14.18, welche mit den verabreichten Antikörpergaben korrelieren. Innerhalb der beiden Patientenkollektive haben unsere Patienten unterschiedliche Maximalwerte. Die „5- Tage-Behandlungsgruppe“ hat nach den ersten Tagen der Zyklen Maximalwerte von 9,6 µg/ml und nach dem fünften Tag der Zyklen Werte von 16,6 µg/ml. Die „10- Tage-Behandlungsgruppe“ dagegen am Anfang der Zyklen Maximalwerte von 14,1 µg/ml und am Ende der Zyklen 19,9 µg/ml ch14.18. Aufgrund der schon hohen Anfangsnulwerte erreicht die „10-Tage-Behandlungsgruppe“ am ersten und letzten Behandlungstag aller Zyklen dennoch höhere Maximalwerte. Will man also von Beginn des Zyklus an hohe Konzentrationen des therapeutisch verabreichten Antikörpers ch14.18 im Serum erzielen, ist die Zyklendauer zu erhöhen. Die Zyklendauer kann aber nicht beliebig gesteigert werden, denn die Erhöhung der Behandlungsdauer musste in früheren Studien meistens schon aufgrund der Nebenwirkungen des Antikörpers selbst oder der Nebenwirkungen der notwendigen Begleitmedikation, wie Morphin, vorzeitig abgebrochen werden (62, 63).

Man sieht bei beiden Behandlungsgruppen eine Akkumulation des Antikörpers ch14.18 am Ende aller Zyklen. Die „10-Tage-Behandlungsgruppe“ hat am ersten und letzten Behandlungstag aller 3 Zyklen im Vergleich zu der „5-Tage-Behandlungsgruppe“ höhere „Baseline“- Werte.

Die „5-Tage-Behandlungsgruppe“ zeigt aber im Vergleich zur „10-Tage-Behandlungsgruppe“ eine 6,5 fach höhere Steigerung der Nullwerte am Ende aller Zyklen, obwohl die „5-Tage-Behandlungsgruppe“ im Vergleich zu der „10-Tage-Behandlungsgruppe“ eine um den Faktor von 1,03 erniedrigte b- Halbwertszeit aufweist. (Das liegt wahrscheinlich an den kürzeren Verabreichungsabständen des Antikörpers, in denen eine Antikörperkumulation stattfinden kann.)

5. Diskussion

Will man eine stärkere Antikörperakkumulation, ist es ratsam die Behandlungsdauer bei fünf Tagen zu belassen, weil eine Verlängerung der Behandlung, wie oben erwähnt, zu unnötigen Nebenwirkungen führt (62, 63).

Die Halbwertszeit der endogenen Immunglobuline, die im Organismus proteolytisch abgebaut werden, beträgt für die der Klassen IgG 1, 2 und 4 ca. 21 bis 23 Tage (183). Immunglobuline der Klasse IgG 3 werden mit einer Halbwertszeit von sieben Tagen schneller metabolisiert (122).

Beim therapeutische Antikörper ch14.18, der ein Immunglobulin der Klasse IgG 1 ist, sollte man eine lange Halbwertszeit erwarten können. Im Gegensatz zu den endogenen Isotypen, die im Organismus gebildet werden, haben therapeutisch applizierte Immunglobuline wie der chimäre Antikörper ch14.18 kürzere Halbwertszeiten (122 und siehe Tab. 11).

Dies zeigten Messungen verschiedener Autoren, die für den chimären Antikörper ch14.18 eine Verteilung nach dem Zwei- Kompartimentmodell mit Halbwertszeiten im Stundenbereich (87, 106, 153, 177) ermittelten.

Die Pharmakokinetikdaten von ch14.18 unterscheiden sich erheblich von denen des murinen 14G2a (85, 188), welcher im Plasma von Melanompatienten eine monophasische Abnahme zeigt. Diese Kurve läßt sich am besten in ein Ein-Kompartimentmodell anpassen. Der murine Antikörper besitzt eine deutlich kürzere Plasmahalbwertszeit von 42h (154, 188), 43,9h (85) und 43h (106) als die Halbwertszeiten des ch14.18 in den Arbeitsgruppen, die mit Seren adulter Patienten arbeiteten (87, 106, 153). Die schnellere Elimination des 14G2a resultiert daraus, dass dieser Antikörper immunogener ist, weil er zu hundert Prozent aus murinen Eiweißbestandteilen besteht.

5. Diskussion

Autor:	Saleh (153)	Khazaeli (87)	LoBuglio (106)	Uttenreuther (177)	HWZ der vorliegenden Studie
HWZa:	24h	21,5h	23h	3,4h	0,4h
HWZb:	181h	175h	185h	66,6h	36,5h

Tab.11: Die Halbwertszeiten a und b des Ak ch14.18 bestimmt von verschiedenen Arbeitsgruppen

Neun Neuroblastompatienten, die ch14.18 verabreicht bekamen, zeigten in der Studie von Uttenreuther et al. (177) eine b- Halbwertszeit von 66,6h. Saleh et al. (153), Khazaeli et al. (87) und LoBuglio et al. (106) kamen zu den oben aufgeführten Halbwertszeiten, indem sie den Antikörper ch14.18 adulten Patienten mit malignem Melanom verabreichten. Die Ähnlichkeit der Halbwertszeiten beruht auf der Tatsache, dass es sich bei obigen drei Studien um eine Arbeitsgruppe handelt.

Unser Patientengut und dasjenige der Arbeitsgruppe von Uttenreuther et al. (177) bestand nur aus pädiatrischen Neuroblastompatienten. Die Halbwertszeiten aus der Literatur sind um einiges länger als die in dieser Studie ermittelten, in der die a- Halbwertszeit im Minuten- (24,6 min) und die b- Halbwertszeit im Stundenbereich (36,5h) liegt. Ähnliche Halbwertszeiten des ch14.18 (HWZa: 42,3min und HWZb: 42,6h), die auch im Minuten- und Stundenbereich lagen, wurden schon in der Universitäts- Kinderklinik Tübingen im Rahmen einer Dissertation im Jahre 1994 gemessen (81).

Man sieht, dass die Halbwertszeiten des ch14.18 bei adulten Melanompatienten höher sind als die Halbwertszeiten von pädiatrischen Neuroblastompatienten. Diese Konstellation unterstützt außerdem die Behauptung, dass die b-

5. Diskussion

Halbwertszeiten des ch14.18, verabreicht bei Erwachsenen, länger sind als bei Kindern (177). Die Abhängigkeit vom Alter auf die Metabolisierung und Pharmakokinetik von verabreichten Stoffen wurden vor langer Zeit schon erkannt (83, 166). In dieser Hinsicht hat die Entwicklungsphase des hepatischen und renalen Systems des Organismus einen großen Einfluß auf die Metabolisierung und Elimination von verabreichten Stoffen. Viele chemische Verbindungen sind vor der Elimination der Leberaktivität mit dessen Entgiftungs- und Metabolisierungsfähigkeit unterworfen. Studien in Mausmodellen haben gezeigt, dass monoklonale Antikörper tatsächlich einer partiellen hepatischen Metabolisierung unterliegen, gefolgt von renaler Elimination (9, 22).

Bei der Analyse der Seren der Neurolastompatienten, wollten wir feststellen, welche Größen einen Einfluß auf die Pharmakokinetik des monoklonalen Antikörpers ch14.18 haben. Die Pharmakokinetik des Antikörpers ch14.18 variiert in unserer Studie nicht nur innerhalb des Patientenkollektivs, sondern auch innerhalb der Behandlungszyklen eines Patienten. Die Erhöhung der Zyklenzahl hat auf die Anfangsphase der raschen Elimination keinen signifikanten Einfluß gezeigt. Im Gegensatz dazu führt die Erhöhung der Zyklenzahl zu einer Erniedrigung der b- Halbwertszeit ($t_{1/2b}$) und somit zu einer Beschleunigung der Endphase der langsamen Elimination. Wiederholte Verabreichungen vom monoklonalen Antikörper ch14.18 bei Kindern mit Neuroblastom führen demnach zu einer erhöhten Antikörper- Clearance. Die Antikörper- Clearance aus dem Serum (b- HWZ) sinkt bei uns bereits beim zweiten Zyklus von 37h auf 30h und vom zweiten auf den dritten Zyklus auf 23h. Eine Abnahme der Elimination von 73 Stunden bereits beim zweiten Zyklus auf 32 Stunden beschrieben auch Uttenreuther et al. (177).

Da unsere Patienten während eines Zyklus täglich Antikörper verabreicht bekommen und unsere ermittelten Halbwertszeiten zwischen 23 bis 37 Stunden liegen, findet eine Antikörperkumulation innerhalb eines Zyklus statt. Diese

5. Diskussion

Tatsache bestätigen auch unsere Werte im Ergebnissteil. Im 1. Patientenkollektiv findet im Laufe der Behandlungszyklen eine 29 fache und im 2. Patientenkollektiv eine 8,4 fache Steigerung des Nullwertes statt. Durch diesen kumulativen Effekt sollen die Neuroblastompatienten profitieren. Die Menge an zirkulierenden Antikörpern kann durch die Erhöhung der Dosis erreicht werden. Der limitierende Faktor der Antikörperdosiserhöhung sind die Nebenwirkungen, die durch die Antikörpergabe hervorgerufen werden. Hierbei muss man aber zwischen Nebenwirkungen unterscheiden, die durch die Gabe von Fremdproteinen verursacht werden, also allergischer Art sind, und Nebenwirkungen, die spezifisch auf die Wirkung des Antikörpers zurückzuführen sind.

Aufgrund diesem limitierenden Faktor legten Handgretinger et al. 1995 die maximal tolerierbare Dosis (MTD) von 50 mg/m²/Tag pro Injektion fest (62). Im Vergleich zu der MTD bekommen die Patienten der Neuroblastomstudie NB97 eine um mehr als die Hälfte niedrigere Dosis von 20 mg/m² täglich verabreicht. Dies alles zeigt die Notwendigkeit, dass in klinischen Studien die optimale Antikörperdosierung herausgefunden werden muss.

Unterschiedliche Halbwertszeiten des Antikörpers $t_{1/2}$ in unserer Studie können durch die Unterschiede in Tumorgröße und Tumorlokalisation erklärt werden. Biologische Eigenschaften des Tumors, wie Größe und heterogene Antigen GD2- Expression können das Ausmaß der monoklonalen Antikörperaufnahme beeinflussen (184), und diese wiederum die Höhe der zirkulierenden Antikörper und deren Pharmakokinetik (23). Zusätzlich werden die monoklonalen Antikörper, die an die Tumorzellen binden, von diesen zum Teil internalisiert und metabolisiert (23). In einem vergrößerten Tumorherd, der genauso gut eine erhöhte Antikörperaufnahme und/oder Metabolisierung seinerseits bewirkt haben könnte. kann somit eine weitere Erklärung für die kürzeren Halbwertszeiten liegen.

Dies ist besonders zutreffend für das Neuroblastom, eine Neoplasie, die häufig aus dem adrenergen Mark entspringt. Daraus können umfangreiche abdominelle

5. Diskussion

Beschwerden, weitverbreitete Metastasen, Hepatomegalie (24), mechanische Obstruktion des Urintraktes und Leberschäden resultieren, welche die Metabolisierungsrate senken (24, 39). Die renale und hepatische Funktion von Neuroblastompatienten könnte ferner durch chirurgische Therapien, durch Chemo- oder Radiotherapie reduziert worden sein, was wiederum bedeutet, dass deren Clearance abnimmt. Das könnte die Erklärung für die verringerte Clearance von ch14.18 sein, was zu längeren Halbwertszeiten, wie bei einigen unserer Patienten der Fall war, geführt hat.

Die Halbwertszeit des monoklonalen Antikörpers wird außerdem noch durch die folgenden Faktoren beeinflusst:

Reuland et. al. beschreiben eine erhöhte Antikörperaufnahme in die Leber, ohne eine Aufnahme in den Tumor beim Verabreichen von hohen Dosen des murinen und chimären Anti-GD2 Antikörpers (147). Diesem atypischen Kinetikverhalten mit hoher Antikörperaufnahme in die Leber könnte die Bildung von Antikörperkomplexen und humanen anti- murin/ chimär Antikörpern zugeschrieben werden (147), was wiederum zu einer Verkürzung der Halbwertszeit führen könnte.

Beschleunigte Elimination von Antikörpern wird in verschiedenen Studien bestätigt. Über eine ähnliche Verkürzung der Halbwertszeit wurde bei einem Patienten nach einer zweiten Infusion von „¹³¹J- labeled chimeric B72.3“ (86) und kürzlich bei zwei Patienten nach wiederholten Infusionen von murinem Antikörper 14G2a (129, 176) berichtet.

Die schnelle Elimination wird durch die Produktion von Antikörpern gegen die verabreichten Antikörper nach dem Anfangsbehandlungszyklus erklärt. Nimmt man an, daß gemäß unseren Patienten ab dem zweiten Zyklus die HACA- Generierung beginnt, kann das eine Erklärung dafür sein, daß die applizierten Antikörper durch das Abfangen des Antikörpers durch Anti- Idiotyp- Antikörper (107) schneller metabolisiert werden. Zweitens lässt sich die Abnahme der b- Halbwertszeit im

5. Diskussion

Laufe der Zyklen dadurch erklären, dass zirkulierende Antikörper vor allem ab dem zweiten Zyklus durch gegen sie gerichtete Antikörper gebunden werden. Die a-Halbwertszeiten ändern sich im Laufe der Zyklen nicht, da Anti-Idiotyp-Antikörper nichts am Verteilungsraum und Verteilungsmodus ändern können. Hier sind es also vor allem die HACAs, die eine beschleunigte Clearance der Immunkomplexe bewirken.

Entsprechend beobachteten wir, dass sechs Patienten unseres Patientenkollektivs (Patient 2, 3, 7, 46, 47, 53), die wiederholt Infusionen von ch14.18 erhalten haben, nicht nur mit einer erhöhten Elimination von diesem Antikörper, sondern auch am Ende der Zyklen mit einer, wenn auch nur mäßigen (2,7 bis 5,5-fachen) „human-anti-chimeric-antibody“ Antwort (HACA), die gegen die Antigenbindungsseite des ch14.18 gerichtet war antworteten.

Von den sieben „HACA-positiven“ Patienten unserer Arbeit (Patient 13, 25, 27, 31, 32, 35, 40) die am Ende der Zyklen 380 bis 10 000-fach höhere Rohwerte an HACA annahmen, standen leider keine Seren zur Messung der Pharmakokinetik zur Verfügung.

Die Pharmakokinetik des ch14.18 der obigen sechs Patienten mit mäßiger HACA-Bildung jedoch deutet auf eine beschleunigte Clearance des ch14.18 hin. Patienten, die kaum HACAs gebildet haben, hatten auch keine signifikante Änderung in der Halbwertszeit, wie in einer anderen Studie auch beschrieben (177).

Zusätzlich können sich die Pharmakokinetikdaten des ch14.18 und die Erkenntnisse über die gebildeten HACAs aus dieser Studie für weitere pädiatrisch klinische Versuche als nützlich erweisen. Solche Pharmakokinetikanalysen könnten bei der Optimierung von Therapieschemen helfen, eine größtmögliche Effizienz in der Immuntherapie des Neuroblastoms zu erreichen. Ein Schema für die Therapie mit monoklonalen Antikörpern ist von grundlegender Bedeutung, da

5. Diskussion

sich die Antikörperbehandlung des Neuroblastoms mit dem monoklonalen Antikörper ch14.18 klinisch noch in experimentellem Status befindet.

5.2.2. Antikörperspiegel

Nimmt man an, die Antitumorwirkung der Immuntherapie sei der Serumkonzentration applizierter Antikörper, in unserem Fall des ch14.18 direkt proportional, wäre es erstrebenswert, höchstmögliche konstante Antikörperspiegel zu erreichen.

Abhängig ist dieser gleichmäßige Wirkstoffspiegel unter anderem von der Dosierung, der Art und Geschwindigkeit der Applikation, der Art des Medikaments, seiner Wasser- oder Fettlöslichkeit und von seiner Metabolisierung. Das Erreichen eines möglichst gleichmäßigen Serumspiegels im therapeutischen Bereich wird angestrebt (55).

Um die infusionsabhängigen Schwankungen der Spiegel, die sehr groß sind, geringer zu halten und dadurch einen möglichst gleichmäßigen Wirkstoffspiegel zu erreichen, müsste die Infusionsdauer verlängert oder sogar auf 24- stündige Infusionen ausgedehnt werden, was jedoch schwer realisierbar und trotzdem zu keinem gleichbleibender Serumspiegel führen würde. In der Neuroblastomstudie NB97 wird der Antikörper nicht als Bolus, sondern in einer 8 stündigen Infusion verabreicht.

Munn et al. (128) fanden einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen applizierter Dosis und erreichter Serumkonzentration. Das 2. Patientenkollektiv mit 10 Behandlungstagen pro Zyklus bekam eine höhere Antikörperdosis verabreicht als das 1. Patientenkollektiv mit 5 Behandlungstagen pro Zyklus. Demzufolge erreichte die „10- Tage- Behandlungsgruppe“ insgesamt höhere Maximal- und Nullwerte als die „5- Tage- Behandlungsgruppe“.

5. Diskussion

In tierexperimentellen Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörpern 3F8, UJ13A und 791T/36 wurde gezeigt, dass nur ein bis acht Prozent der applizierten Antikörperdosis tatsächlich das Tumorgewebe erreichen (69, 82, 128, 140). Die restliche Menge wird wie auch bei Menschen proteolytisch gespalten (122).

Duerst et al. postulieren eine für CDC- Mechanismen in vitro optimale Konzentration von fünf bis zehn Mikrogramm Antikörper pro Milliliter (46). Dies bedeutet eine fünf bis zehnfach höhere Menge Antikörper als die, welche zur Sättigung aller Bindungsstellen nötig ist.

Antikörper führen letztlich zur Lyse der antigenexprimierenden Zellen, nachdem sie an zellgebundenes Antigen binden und dadurch ADCC oder CDC aktivieren. Wenn viele Determinanten auf einer Zelle vorhanden sind, kann eine optimale Lyse der Zellen bei Bindung einer optimalen Menge an Antikörper erreicht werden (126). Leider ist die klinische Wirkung der Therapie mit unserem monoklonalen Antikörper häufig limitiert durch die Expression des Tumorantigens GD2 sowohl auf gesundem als auch auf malignem Gewebe. Die Antikörperbindung ist limitiert wenn Antigen- Heterogenität im Tumor herrscht (13) und wenn die Konzentration vom tumorassoziierten Antigen im Tumor nicht signifikant höher ist als die Konzentration des Antigens in umliegenden Gewebe. Das Tumorantigen, das als Ziel für die Antikörpertherapie mit ch14.18 dient, ist das Disialogangliosid GD2, welches ausgedehnt auf Melanom- (125) und Neuroblastomzellen (127, 159) exprimiert wird. Die Antigendichte ist mit bis zu $1,5 \times 10^7$ Bindungsstellen pro Zelle hoch.

Wie erwähnt hängt auch beim Neuroblastom die Bindung des Antikörpers mit nachfolgender Lyse von der Dichte des GD2 auf der Zelloberfläche ab. Weil auch über eine geringere GD2- Dichte auf reiferen Zellen berichtet wurde, können Neuroblastomzellen mit geringer GD2- Antigendichte der Antikörpertherapie entkommen (186). Folglich kann bei antigennegativen Zellen auch keine Lyse der Zellen erreicht werden (76).

5. Diskussion

Faktoren wie Struktur und Funktion des verabreichten Antikörpers, dessen in vivo-Verteilung und die Beschaffenheit des Tumors können die Wirkung des Antikörpers limitieren und die Antikörper- Tumor- Interaktion positiv oder negativ beeinflussen.

Die Antikörperaufnahme in den Tumorknoten wird auch stark von anderen Faktoren beeinflusst. Diese wären unter anderem die Anwesenheit von Mikrogefäßen als Folge einer Angiogenese am Tumor (101).

Ein wesentlicher Faktor ist auch die schlechte Penetration von makromolekularen Immunglobulinen in den Tumor. Die dichte Lagerung der Karzinomzellen, das zusätzliche fibröse Stroma, der erhöhte interstitielle Druck im Tumorgewebe, der den passiven Transfer des Antikörpers aus dem umliegenden Gewebe in den Tumor verhindert (77, 79), die oft insuffiziente lymphatische Drainage und die perivaskuläre Absorption der Antikörper in den ersten gefäßnahen Tumorzellschichten können Ursachen für die schlechte Penetration sein. Eine mögliche Lösung des Problems bestünde darin, die den Tumor versorgenden Gefäßstrukturen anstelle der Tumorzellen selbst als Angriffsort einer spezifischen Immuntherapie auszuwählen.

Aufgrund dieser oben genannten Faktoren, wird die Antikörpertherapie als Immuntherapie des Neuroblastoms allein nicht in der Lage sein große Tumormassen zu beseitigen. Ein rationaler Einsatz der monoklonalen Antikörper wäre dann eher diese als adjuvante Immuntherapie im Anschluß an die konventionelle Therapie zu sehen. Dieser Ansatz wird auch hier in der Neuroblastomstudie NB97 angewandt. Um die hohe Rezidivierungsrate des Neuroblastoms zu verringern, versetzt man das Immunsystem des Patienten in die Lage, Resttumor über die vermittelnde Wirkung der monoklonalen Antikörper zu beseitigen.

5. Diskussion

5.2.3. Immunantwort

Wie bereits erwähnt, standen uns aus der noch fortlaufenden Neuroblastomstudie NB97 Seren von 55 Patienten zur HACA- Bestimmung zur Verfügung. Berücksichtigt wurden nur Patienten, die zum Zeitpunkt der Arbeit 4 oder 7 Zyklen absolviert hatten. 12,7%, also 7 von den mit dem monoklonalen Antikörper ch14.18 behandelten 55 Patienten wiesen hohe HACA- Werte auf.

Mehrere Untersucher verabreichten ch14.18 allein. Zum Beispiel beobachteten Saleh et al. unter 13 erwachsenen Patienten mit metastasierendem Melanom 8 HACA- Entwicklungen (153). Yu et al. stellten hingegen bei 7 von 10 Neuroblastompatienten eine HACA- Generierung fest (189).

Die HACA- Werte der 7 Patienten steigen während der Immuntherapie im Laufe der Zyklen kontinuierlich an und nehmen relativ um mindestens das 90 fache des Ausgangswertes am 1. Tag des 1.Zyklus zu. Diese Grenze von 90 fachem des Ausgangswertes wurde anhand der erhobenen Daten festgelegt. Die HACA- Werte können nicht richtig miteinander verglichen werden, da die HACA- positiven Patienten nicht die gleiche Anzahl an Zyklen verabreicht bekommen haben. Bei 4 der obigen 7 Patienten sieht man schon ab dem 2.Zyklus, bei einem ab dem 3.Zyklus und bei zwei Patienten ab dem 4.Zyklus eine HACA- Positivierung.

Wie in der Studie von Özkaynak et al. (132) ist auch in dieser Arbeit bis zum Ende des zweiten Zyklus keine HACA- Antwort festgestellt worden. Ab dem zweiten Zyklus besitzt jedoch die Anzahl der Behandlungszyklen einen kumulativen Effekt auf die HACA- Generierung. Im Gegensatz dazu zeigt die unterschiedliche Dauer eines Therapiezyklus keinen signifikanten Einfluß auf die Bildung von HACAs. Die Dauer eines Therapiezyklus lag entweder bei 5 oder 10 Tagen. Die restlichen Patienten, 48 an der Zahl, sind im Gegensatz zu den HACA- positiven als HACA- negativ betrachtet worden.

5. Diskussion

Die Entwicklung eigener Antikörper, bei Therapien mit fremdem Eiweiß zur Immunisierung der Patienten stellt ein großes Problem dar. Diese Immunisierung kann sowohl zu schweren Nebenwirkungen, wie bereits erwähnt, als auch zu einer Neutralisierung des applizierten Medikaments und zu dessen Wirkungsverlust führen (158). Will man also ausschließlich die direkte Wirkung des verabreichten Antikörpers, sollte die Zyklenzahl möglichst gering gehalten werden.

Schon während oder kurz nach der Therapie mit murinen monoklonalen Antikörpern gegen Tumoroberflächenantigene entwickelten sich endogene HAMA's („human- anti- mouse- antibodies“). Darüber berichteten mehrere Autoren, wie Cheung et al. (33). Sie beobachteten bei 17 Neuroblastom- und Melanompatienten ab Applikationsdosen von 20 mg/m² des murinen monoklonalen Anti- GD2- Antikörpers 3F8 eine von weiteren Dosissteigerungen unabhängige HAMA- Bildung. Patienten, die signifikante HAMA- Serum- Konzentrationen aufwiesen, zeigten minimale Nebenwirkungen, doch keine Antitumorwirkung. Auch Vadhan et al. hatten bei der Behandlung von 21 Patienten mit malignem Melanom durch den Anti- GD3- Antikörper R24 gezeigt, daß Patienten mit meßbarer Tumorregression erst verspätet mit der Produktion endogener Anti- Maus- Immunglobuline reagiert haben (178). Andere Studien hingegen zeigten keine Korrelation zwischen Anti- Maus- Antikörperentwicklung und einem Ansprechen auf die Immuntherapie (54, 149). Eine ähnliche Beobachtung beschrieben Handgretinger et al. bei einer Therapiedauer von mehr als sechs Tagen mit Dosierungen von über 20mg/m²/Tag murinen monoklonalen Antikörper 14G2a (63). Aufgrund dieser Beobachtung erschien eine Verlängerung der Therapiedauer weniger sinnvoll, um höhere Spiegel zu erreichen. Somit wurde der Infusionszeitraum auf fünf Tage beschränkt.

Miller et al. berichteten auch über die Entwicklung von humanen Anti- Maus- Immunglobulinen bei vier von sieben T- Zell- Lymphompatienten, die mit dem

5. Diskussion

anti- Leu 1 MAK behandelt wurden (119). Bei drei dieser vier Patienten verhinderten die HAMAs ein Ansprechen auf die Immuntherapie.

Endogene Immunglobuline sind hauptsächlich gegen das Fc- Fragment fremder Immunglobuline gerichtet und in geringem Maße auch allein gegen das F(ab')₂- Fragment (37). Bei dem von uns therapeutisch verwendeten chimären monoklonalen Antikörper ch14.18 ist dieses F(ab')₂- Fragment gentechnologisch durch ein menschliches Fragment ersetzt worden, wodurch das Immunglobulin an Immunogenität verliert. Trotzdem sind Anti- Idiotyp- Antikörper (bei uns HACAs= „human- anti- chimeric- antibody“) nachgewiesen worden, die zwar in geringer Konzentration gebildet wurden, aber dennoch zu Immunkomplexen führten (106). Handgretinger et al. beobachteten in einer Phase I Studie, daß keine ihrer neun mit ch14.18 behandelten Patienten mit einer HAMA- Antwort reagierten. Mit ihrem benutzten ELISA konnten sie aber eine HACA- Entwicklung nicht ausschließen (62). Der chimäre Antikörper ch14.18 ist im Wesentlichen weniger immunogen als der murine Antikörper 14G2a (85, 154, 188). Alle mit dem 14G2a behandelten Patienten entwickelten eine prompte Immunantwort mit Antikörperlevel, die 100-1000 fach höher sind, als die Immunantwort der Patienten, denen ch14.18 verabreicht worden ist (85, 154). Studien suggerieren, dass die Immunantwort auf ch14.18 ausschließlich auf die murine variable Region (anti- idio type) gerichtet ist. Diese „anti- Idiotyp“- Antwort scheint aber keine Auswirkung auf das klinische Resultat zu haben, weil die Überlebensrate von mit oder ohne Antikörper behandelten Patienten ähnlich waren (154).

Über die Entwicklung endogener humaner Anti- Chimär- Antikörper (HACAs) schon während oder kurz nach der Therapie gegen therapeutisch applizierte chimäre Immunglobuline die gegen Tumorerflächenantigene gerichtet sind, wurde bereits berichtet. Auch die Folge der möglichen Neutralisierung der verabreichten Antikörper oder die Möglichkeit allergischer oder anderer immunologischer Reaktionen sind als mögliche Komplikationen der Immuntherapie ebenfalls bekannt (4, 44, 87, 119).

5.2.4. Netzwerk – Hypothese

Wenngleich die Generierung von Antikörpern gegen den therapeutischen Antikörper primär einen negativen Einfluß auf die Wirkung haben sollten, wird gleichzeitig jedoch von einigen Forschergruppen die Immunreaktion gegen den therapeutischen Antikörper als erster Schritt in der Ausbildung eines Idiotyp-Netzwerkes betrachtet (90). Folgt man der Idiotyp- Netzwerk Hypothese von Lindenmann und Jerne (80, 103), kann die Ausbildung von anti- Idiotyp- Antikörpern weiter zu Bildung von anti- anti- Idiotyp Antikörpern führen. Im Idealfall erkennen diese anti- anti- Idiotyp Antikörper das Antigen, das von dem therapeutisch applizierten Antikörper erkannt wird (80), was gleichbedeutend mit der Vakzinierung gegen dieses Epitop ist.

Setzt man auf das Idiotyp- Netzwerk, sollte man den Patienten mehr Zyklen verabreichen, um mehr endogen gebildete HACAs zu generieren. Denn gemäß unseren Ergebnissen steigt mit der Steigerung der Zyklenzahl auch der Anteil der „HACA- positiven“ am Gesamtpatientenkollektiv.

Auch die Induktion von anti- Idiotyp reaktiven T- Zellen wird in Erwägung gezogen (53). Cheung et al. postulieren, daß die erfolgreiche Induzierung von einem Idiotyp Netzwerk in Neuroblastompatienten mit dem Antikörper 3F8 verantwortlich für die Langzeit Tumorkontrolle ist (32). Deshalb wären weitere Untersuchungen über diese sogenannten anti- anti- Idiotyp Antikörper in nachbehandelten Seren notwendig, bevor in dieser Hinsicht eine noch definitivere Schlussfolgerung gemacht werden kann.

Angesichts der kleinen Anzahl von Patienten in dieser Studie, sollte man vorsichtig sein, zu viele generalisierte Schlußfolgerungen zu ziehen. Die Gesamthalbwertszeiten von ch14.18 mit einem Median von 37h sind im Vergleich zu denen des murinen Idiotyps 14G2a beträchtlich länger (176). Die längere Halbwertszeit und verminderte Immunogenität von ch14.18 im Gegensatz zum

5. Diskussion

murinen Idiotyp 14G2a deutet darauf hin, dass dieser humanisierte monoklonale Antikörper potentiell nützlicher für die Behandlung des Neuroblastoms ist (85, 188).

5.3.Schwierigkeiten der Krebstherapie und weitere Perspektiven

Die Krebsbehandlung ist durch eine Vielzahl von Faktoren begrenzt. Diese beinhalten unter anderem den niedrigen therapeutischen Index der meisten chemotherapeutischen Pharmaka, die Entstehung von Resistenzen in der Bevölkerung im Bezug auf medikamentöse Therapie und Strahlentherapie, die Tumorerogenität und zu guter letzt die Präsenz von Metastasen. Selektive oder zielgerichtete Verteilung der chemischen Substanzen an die Tumorstellen ist ein Versuch den therapeutischen Index derer zu verbessern. Die tumorgerichtete Therapie hat das Potential die Effizienz zu verbessern und die Toxizität zu minimieren, indem sie die intratumorale Konzentration der markierten Pharmaka erhöht und zugleich die systemische Exposition verringert. Monoklonale Antikörper, Fragmente monoklonaler Antikörper, Hormone und Wachstumsfaktoren sind verwendet worden, um die Medikamente, Toxine, Radionuklide, Enzyme, Photosensitizer und Zytokine an die Tumoren zu verteilen (171).

Monoklonale Antikörper, die gegen tumorassoziierte Antigene gerichtet sind, sind chemisch mit Zytokinen konjugiert worden, die verschiedene Wirkungsmechanismen und verschiedene Stärkelevel besitzen. Diese Verbindungen können die Wirkung des therapeutischen Antikörpers verstärken und die systemische Toxizität verringern. Deshalb richten neueste Forschungen ihr Augenmerk auf sogenannte Antitumorantikörper/ Zytokin- Fusionsproteine, wobei ein Zytokin mit einem monoklonalen Antikörper gekoppelt wird. Das Antidisialogangliosid GD2 Antikörper- IL2- Fusionsprotein ch14.18- IL2 ist in Hinsicht auf seine Wirkung gegen das metastasierende Neuroblastom Gegenstand vieler Untersuchungen. Sabzevari et al. zeigte 1994, daß die Kombination des Zytokins IL2 mit dem chimären anti- GD2- Antikörper ch14.18 bei der

5. Diskussion

Unterdrückung von Disseminierung und Wachstum des Neuroblastoms im Tierversuch wirksamer ist als die Gabe von rekombinantem IL2 allein (150). Die Untersuchungen der folgenden Jahre zeigte große Erfolge mit ch14.18 im Tierversuch (10, 108, 109, 137). Als die verantwortlichen Zellen bei dieser durch ch14.18- IL2 vermittelten Immunantwort werden NK- Zellen betrachtet (108).

Durch die Verbindung des Zytokins GM- CSF mit ch14.18 erhofft man sich ebenfalls einen zellvermittelten Angriff direkt am Tumor durch die stimulierende Wirkung des Zytokins.

6. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist einer der malignesten Tumoren des frühen Kindesalters. Die Ergebnisse der bisherigen konventionellen Therapie des metastasierenden Neuroblastoms waren unbefriedigend. Trotz der intensiven Chemotherapie mit anschließender allogener und/ oder autologer Knochenmarktransplantation, die Kinder im Stadium IV erfahren, konnte in der Therapie des metastasierenden Neuroblastom kein entscheidender Durchbruch erreicht werden. Die meisten Patienten entwickelten trotz der Therapiemassnahmen Rezidive.

Mit der Charakterisierung tumorspezifischer Oberflächenantigene und der Möglichkeit dagegen monoklonale Antikörper herzustellen, die zusammen mit dem körpereigenen Immunsystem in der Lage sind, Tumorzellen in vitro zu lysieren, wurden der Onkologie zur Behandlung maligner Erkrankungen neue und erfolgreiche Wege eröffnet.

Da das Oberflächenantigen GD2 in großem Ausmaß auf den Neuroblastomzellen vorhanden ist, wurden verschiedene Antikörper entwickelt, die das Gangliosid spezifisch binden können. Erste Studien, die mit dem Antikörper 14G2a durchgeführt wurden, erwiesen sich als erfolgsversprechende Konzepte. Dieser murine Antikörper zeigte sich aber in höchstem Maße immunogen, indem der Patient humane anti- Maus- Antikörper (HAMAs) dagegen generierte. Um diese Problematik zu umgehen, wurden Mensch/ Maus chimäre Antikörper konstruiert.

Mit dem chimären monoklonalen Anti- GD2- Antikörper ch14.18 steht ein in vitro sehr effektiver Antikörper für die Therapie des Neuroblastoms zur Verfügung. Wegen seiner geringeren Immunogenität, die in klinischen Studien erwiesen wurden, hat der chimären monoklonalen Anti- GD2- Antikörper ch14.18 den murinen Antikörper 14G2a in der klinischen Anwendung vollständig abgelöst.

Um der Frage nachzukommen, in welchem Maße dieser Antikörper aufgrund seines geringen Mausanteils immunogen ist, sind daraufhin insgesamt Seren von 55 Patienten aus der Neuroblastomstudie NB97 untersucht worden. In früheren

6. Zusammenfassung

Studien wurden im Vergleich zu unseren 55 Patienten nur kleine Patientenkollektive untersucht. Dabei untersuchten Handgretinger et. al (62) neun Neuroblastompatienten auf eine HACA- Positivierung, Yu et. al (189) zehn und Uttenreuther- Fischer et al. (177) fünf Patienten.

Die Antikörperapplikationen wurden täglich, über 5 oder 10 Tage durchgeführt. Das Gesamtpatientenkollektiv wurde gemäß den Behandlungstagen in zwei Patientenkollektive geteilt. Die verabreichte Tagesdosis lag bei 20 mg/m²/Tag.

Zunächst wurden die durch die Antikörperinfusion erreichten Serumspiegel mit einer ELISA Methode bestimmt, bei der das Antigen direkt auf Testplatten gebunden wurde. Die Konzentrationsspitzen des chimären Antikörpers stiegen in beiden Patientenkollektiven auf maximale Werte von 9,6 µg/ml und 19,9 µg/ml. Die Serumkonzentrationen der „5- Tage- Behandlungsgruppe“ nahmen im Laufe der Behandlungszyklen im Vergleich zur „10- Tage- Behandlungsgruppe“ 6,5 fach höhere Werte an.

Die pharmakokinetischen Analysen ergaben eine Serumelimination, die mit den pharmakologischen Vorstellungen eines Zwei- Kompartimentenmodells am besten zu beschreiben waren. Dabei ergab die Bestimmung der schnellen Verteilungsphase eine a- Halbwertszeit von 24,6 Minuten und für die langsame, eigentliche Eliminationsphase eine b- Halbwertszeit von 36,5 Stunden. Die Erhöhung der Zyklenzahl beschleunigte die langsame Eliminationsphase bis auf 23 Stunden nach dem dritten Zyklus.

Sieben der behandelten Patienten entwickelten zwischen dem zweiten und vierten Zyklus deutlich messbare humane Anti- Chimär- Antikörper (HACAs). Es zeigte sich eine Proportionalität zwischen der Anzahl der Zyklen und der HACA- Positivierung. Dies sieht man an dem kumulativen Effekt der Behandlungszyklenanzahl auf die HACA- Generierung. Wohingegen die Höhe und die Dauer bis zum Auftreten der Immunantwort von der Dosis und der Zyklusdauer unabhängig war.

Diese Ergebnisse und jene aus früheren Studien und aus der Literatur deuten darauf hin, dass der monoklonale Antikörper ch14.18 weniger immunogen ist als

6. Zusammenfassung

sein Idiotyp 14G2a und somit die adjuvante Verabreichung des ch14.18 eine bessere Überlebenschance für die Patienten darstellt. Diese Befunde schließen jedoch weitere notwendige Untersuchungen nicht aus.

7. Literatur

- 1.) Abbas, A., Lichtmann, A., Pober, J. (1994)
Cellular and Molecular Immunology
2. Aufl., W.B. Saunders, Philadelphia
- 2.) Abemayor, E., Chang, B., Sidell, N. (1990)
Effects of Retinoic Acid on the In Vivo Growth of Human Neuroblastoma Cells
Cancer Lett., 55(1), 1-5
- 3.) Albertini, M.R., Gan, J., Jaeger, P., Hank, J.A., Storer, B., Schell, K., Rivest, T., Surfus, J., Reisfeld, R.A., Schiller, J.H., Sondel, P.M. (1996)
Systemic interleukin-2 modulates the anti-idiotypic response to chimeric anti-GD2 antibody in patients with melanoma
J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol., 19, 278-295
- 4.) Albertini, M.R., Hank, J.A., Schiller, J.H., Khorsand, M., Borchert, A.A., Gan, J., Bechhofer, R., Storer, B., Reisfeld, R.A., Sondel, P.M. (1997)
Phase IB trial of chimeric antidisialoganglioside antibody plus interleukin 2 for melanoma patients
Clin. Cancer Res., 3, 1277-1288
- 5.) Ater J.L., Gardner K.L., Foxhall L.E., Therrell B.L. Jr, Bleyer W.A. (1998)
Neuroblastoma screening in the United States: results of the Texas Outreach Program for neuroblastoma screening.
Cancer, 82(8): 1593-1602
- 6.) Bader, P. (1991)
Behandlung des metastasierenden Neuroblastom IV mit dem murinen monoklonalen Antikörper 14G2a
Medizinische Dissertation der Universität Tübingen
- 7.) Barker, E., Mueller, B.M., Handgretinger, R., Herter, M., Yu, A.L., Reisfeld, R.A. (1991)
Effect of a Chimeric Anti-Ganglioside GD2-Antibody on Cell mediated Lysis of Human Neuroblastoma Cells
Cancer Res., 51, 144-149
- 8.) Barker, E., Reisfeld, R.A. (1993)
A mechanism for neutrophil-mediated lysis of human neuroblastoma cells
Cancer Res., 53(2), 362-367

7. Literatur

- 9.) Beatty, J.D., Beatty, B.G., O'Conner-Tressel, M., Do, T., Paxton, R.J. (1990)
Mechanisms of tissue uptake and metabolism of radiolabeled antibody – role of antigen: antibody complex formation.
Cancer Res., 50(3 Suppl), 840s- 845s
- 10.) Becker, J.C., Pancook, J.D., Gillies, S.D., Mendelsohn, J., Reisfeld, R.A. (1996)
Eradication of human hepatic and pulmonary melanoma metastases in SCID mice by antibody-interleukin 2 fusion proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A, 93(7), 2702-2707
- 11.) Beckwith, J.B., Perrin, E. (1963)
In situ neuroblastomas: a contribution to the natural history of neural crest tumours.
Amer. J. Path., 43, 1089-1093
- 12.) Bell, J., Colaneri, J. (2000)
Basiliximab (Simulect): simplifying induction therapy
Nephrol Nurs J, 27(2), 243-244
- 13.) Berkower, I. (1996)
The promise and pitfalls of monoclonal antibody therapeutics.
Curr Opin Biotechnol, 7(6), 622-628
- 14.) Berthold, F.
Overview : Biology of Neuroblastoma, 2-19
in: Pochedly, C.: Neuroblastoma: Tumor Biology and Therapy
CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston
- 15.) Berthold, F. (1985)
Multizentrische Therapiestudie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie (GPO) zur Behandlung von Neuroblastomen bei Kindern und Jugendlichen (Therapiestudie NB 85). Studienleitung: F. Berthold, UNI-Kinderklinik Feulgenstraße 12, 6300 Gießen.
- 16.) Berthold, F (1998)
Neuroblastomstudie NB97
Studienprotokoll
Köln
- 17.) Berthold, F., Hero, B. (2000)
Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach.
Drugs, 59(6), 1261-1277

7. Literatur

- 18.) Berthold, F., Kaatsch, P., Evers, G., Harms, D., Jürgens, H., Niethammer, D., Ritter, J., Wahlen, W., Treuner, J., Lampert, F. (1984)
Intensive Kombinationschemotherapie und β -Interferon zur Behandlung von Kindern mit metastasiertem Neuroblastom: Studie GPO-NB 79/82.
Klin. Pädiat., 196, 143-149
- 19.) Berthold, F., Kesting, G., Sieverts, H. (1989)
Behandlung von Kindern mit Neuroblastom. Neue Kriterien und gegenwärtiger Stand.
Sozialpädiatrie in Praxis und Klinik, 11, 19-22
- 20.) Bernstein, N., Starnes, C., Levy, R. (1988)
Specific enhancement of the therapeutic effect of anti-idiotypic antibodies on a murine B cell lymphoma by IL-2.
J Immunol., 140(8), 2839-2845.
- 21.) Black, P.H. (1980)
Shedding from the Cell Surface of Normal and Cancer Cells
Adv. Cancer Res., 32, 75-199
- 22.) Blakey, D.C., Skilleter, D.N., Price, R.J., Thorpe, P.E. (1988)
Uptake of native and deglycosylated ricin A-chain immunotoxins by mouse liver parenchymal and non-parenchymal cells in vitro and in vivo.
Biochim Biophys Acta., 968(2), 172- 178
- 23.) Boerman, O.C., Sharkey, R.M., Blumenthal, R.D., Aninipot, R.L., Goldenberg, D.M. (1992)
The presence of a concomitant bulky tumor can decrease the uptake and therapeutic efficacy of radiolabeled antibodies in small tumors.
Int J Cancer, 51(3), 470-475
- 24.) Brodeur, G.M. (1991)
Neuroblastoma and other peripheral neuroectodermal tumors:
In: Fernbach, D.J., Vietti, T.J. (eds)
Clinical pediatric oncology. Mosby Year Book. St. Louis, p 437
- 25.) Brodeur, G.M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N.L.T., Castel, V., Castleberry, R.P., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., Hedborg, F., Kaneko, M., Kemshead, J., Lampert, F., Lee, R.E.J., Look, Th., Pearson, A.D.J., Philip, Th., Roals, B., Sawada, T., Seeger, R.C., Tsuchida, Y., Vouïte, P.A. (1993)
Revision of the International Criteria for Neuroblastoma Diagnosis, Staging and Response to Treatment.
J. Clin. Oncol., 11, 1466-1477

7. Literatur

- 26.) Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Barret, A., Berthold, F., Castleberry, R.P., D'Angio, J., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., Freeman, A.I., Haase, G., Hartmann, O., Hayes, F.A., Helson, L., Kemshead, J., Lampert, F., Ninane, J., Ohkawa, H., Philip, Th., Pinkerton, C.R., Pritchard, J., Sawada, T., Siegel, S., Smith, I.E., Tsuchida, Y., Voûte, P.A. (1988)
International Criteria for Diagnosis, Staging, and Response to Treatment in Patients With Neuroblastoma
J. Clin. Oncol., 6, 1874-1881
- 27.) Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., Bishop, J.M. (1984)
Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage
Science., 224(4653), 1121-1124
- 28.) Buist, M.R.; Kenemans, P.; van Kamp, G.J.; Haisma, H.J. (1995)
Minor human antibody response to a mouse and chimeric monoclonal antibody after a single i.v. infusion in ovarian carcinoma patients: a comparison of five assays.
Cancer Immunol Immunother., 40, 24-30
- 29.) Carney, D.N., Marangos, P.J., Ihde, D.C., Bun, P.A. Jr., Cohen, M.H., Minna, J.D., Gazdar, A.F. (1982)
Serum Neuron-Specific Enolase: A Marker for Disease Extent and Response to Therapy of Small-Cell Lung Cancer
Lancet, 15(1), 583-585
- 30.) Cheresch, D.A., Rosenberg, J., Mujoo, K., Hirschowitz, L., Reidfeld, R.A. (1986)
Biosynthesis and Expression of the Disialoganglioside GD2, a Relevant Target Antigen on Small Cell Lung Cancer, for Monoclonal Antibody Mediated Cytolysis
Cancer Res., 46, 5112-5118
- 31.) Cheung N.-K.V., Cheung, I.Y., Canete, A., Yeh, S.J., Kushner, B., Bonilla, M.A., Heller, G., Larson, S.M. (1994)
Antibody response to murine anti-GD2 monoclonal antibodies: correlation with patient survival
Cancer Res., 54, 2228-2233
- 32.) Cheung, N.-K.V., Guo, H.F., Heller, G., Cheung, I.Y. (2000)
Induction of Ab3 and Ab3' antibody was associated with long-term survival after anti-G(D2) antibody therapy of stage 4 neuroblastoma.
Clin Cancer, 6(7), 2653-2660

7. Literatur

- 33.) Cheung, N.-K.V., Lazarus, H., Miraldi, F.D., Abramowsky, C.R., Kallick, S., Saarinen, U.M., Spitzer, T., Strandjord, S.E., Coccia, P.F., Berger, N.A. (1987)
Ganglioside GD2 Specific Monoclonal Antibody 3F8: A Phase I Study in Patients with Neuroblastoma and Malignant Melanoma
J. Clin. Oncol., 5, 1430-1440
- 34.) Cheung, N.-K.V., Lazarus, H., Miraldi, F.D., Berger, N.A., Abramowsky, C.R., Saarinen, U.M., Spitzer, T., Strandjord, S.E., Coccia, P.F. (1992)
Reassessment of patient response to monoclonal antibody 3F8.
J Clin Oncol, 10(4), 671-672
- 35.) Cheung, N.-K.V., Saarinen, U.M., Neely, J.E., Landmeier, B., Donovan, D., Coccia, P.F. (1985)
Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells.
Cancer Res, 45(6), 2642-2649
- 36.) Christiansen, H., Sahin, K., Berthold, F., Hero, B., Terpe, H.J., Lampert, F. (1995)
Comparison of DNA aneuploidy, chromosome 1 abnormalities, MYCN amplification and CD44 expression as prognostic factors in neuroblastoma.
Eur J Cancer, 31A(4), 541-544
- 37.) Courtenay-Luck, N.S., Epenetos, A.A., Moore, R., Larche, M., Pectasides, D., Dhokia, B., Ritter, M.A. (1986)
Development of Primary and Secondary Immune Responses to Mouse Monoclonal Antibodies Used in the Diagnosis and Therapy of Malignant Neoplasms
Cancer Res., 46, 6489-6493
- 38.) Craft, A.W., Parker, L., Dale, G., McGill, A.C., Seviour, J.A., Bell, S., Cole, M., Smith, J. (1992)
A pilot study of screening for neuroblastoma in the north of England.
Am J Pediatr Hematol Oncol., 14(4), 337-341
- 39.) D'Angio, G.J., Evans, A.E., Koop, C.E. (1971)
Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis.
Lancet, 1(7708), 1046- 1049
- 40.) Dannecker, G., Leidig, E., Treuner, J., Niethammer, D. (1983)
Late Recurrence of Neuroblastoma. A Reason for Prolonged Follow-Up?
Am J Pediatr Hematol Oncol., 5(3), 271-274

7. Literatur

- 41.) David, K., Ollert, M.W., Juhl, H., Vollmert, C., Erttmann, R., Vogel, C-W., Bredehorst, R. (1996)
Growth arrest of large solid human neuroblastoma xenografts in nude rats by natural IgM from healthy humans
Nat. Med., 2, 686-689
- 42.) Delamares, S. (1982)
Neuroblastoma of the Abdomen and Pelvis, 51-61,
in: Pochedly, C.: Neuro- blastoma: Clinical and Biological Manifestations;
Elsevier Science Publishing Company, New York Amsterdam
- 43.) Demidem, A., Lam, T., Alas, S., Hariharan, K., Hanna, N., Bonavida, B. (1997)
Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs
Cancer Biother Radiopharm, 12(3), 177-186
- 44.) Dillman, R.O. et al. (1983)
Monoclonal Antibody Therapy of Cutaneous T-Cell-Lymphoma (CTCL).
Blood, 62, 212
- 45.) Dopfer, R., Berthold, F., Einsele, H., Ehninger, G., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Bruchelt, G., Niethammer, D., Stollmann, B., Rister, M., Bender-Götze, C. (1989)
Bone Marrow Transplantation in children with neuroblastoma
Folia Haematol., 116, 427
- 46.) Duerst, R.E., Ryan, D.H., Frantz, C.N. (1986)
Variables affecting the killing of cultured human neuroblastoma cells with monoclonal antibody and complement.
Cancer Res, 46(7), 3420-3425
- 47.) Ekberg, H., Backman, L., Tufveson, G., Tyden, G., Nashan, B., Vincenti, F. (2000)
Daclizumab prevents acute rejection and improves patient survival post transplantation: 1 year pooled analysis
Transpl Int., 13(2), 151-159
- 48.) Erttmann, R., Schmitt, C., Ollert, M.W., David, K., Bredehorst, R., Vogel, C-W. (1996)
Naturally occurring humoral cytotoxicity against neuroblastoma (NB) cells in healthy persons and NB patients
Paediatr. Haematol. Oncol., 13, 545-548

7. Literatur

- 49.) Evans, A.E. (1980)
Natural history of Neuroblastoma, 3-12
in: Evans, A.E.: Advances in Neuroblastoma Research, 1980
Raven Press, New York
- 50.) Evans, A.E., D'Angio, G.J., Randolph, J. (1971)
A Proposed Staging for Children with Neuroblastoma.
Children's Cancer Study Group A
Cancer, 27, 374-378
- 51.) Evans, A.E., D'Angio, G.J., Randolph, J. (1971)
Prognostic factors in neuroblastoma
Cancer, 59, 1853-1859
- 52.) Evans, A.E., Chatten, J., D'Angio, G.J., Gerson, J.M., Robinson, J.,
Schnauffer, L. (1980)
A Review of 17 Stage IV-S Neuroblastoma Patients at the Children's Hospital
of Philadelphia
Cancer, 45, 833-839
- 53.) Fagerberg, J., Frodin, J.E., Ragnhammar, P., Steinitz, M., Wigzell, H.,
Mellstedt, H. (1994)
Induction of an immune network cascade in cancer patients treated with
monoclonal antibodies (ab1). II. Is induction of an anti-idiotypic reactive T cells
(T3) of importance for tumour response to mAb therapy?
Cancer Immunol. Immunother., 38, 149-159
- 54.) Foon, K.A., Schroff, R.W., Bunn, P.A., Mayer, D., Abrams, P.G., Fer, M.,
Ochs, J., Bottino, G.C., Sherwin, S.A., Carlo, D.J., Herbermann, R.B.,
Oldham, R.K. (1984)
Effects of monoclonal antibody therapy in patients with chronic lymphocytic
leukemia.
Blood, 64(5), 1085-1093
- 55.) Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (2001)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
8.Auflage, Urban & Fischer, Deutschland
- 56.) Frost, J.D., Hank, J.A., Reaman, G.H., Friedrich, S., Seeger, R.C., Gan, J.,
Anderson, P.M., Ettinger, L.J., Cairo, M.S., Blazar, B.R., Krailo, M.D.,
Matthay, K.K., Reisfeld, R.A., Sondel, P.M. (1997)
A phase I/II trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus
interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the
Children's Cancer Group.
Cancer, 80(2), 317-33

7. Literatur

- 57.) Garaventa, A., Rondelli, R., Lanino, E., Dallorso, S., Dini, G., Bonetti, F., Arrighini, A., Santoro, N., Rossetti, F., Miniero, R., Andolina, M., Amici, A., Indolfi, P., Lo Curto, M., Favre, C., Paolucci, P., Pession, A., De Bernardi, B. (1996)
Myeloablative therapy and bone marrow rescue in advanced neuroblastoma. Report from the Italian Bone Marrow Transplant Registry. Italian Association of Pediatric Hematology-Oncology, BMT Group.
Bone Marrow Transplant., 18(1), 125-30
- 58.) Geatti, O., Shapiro, B., Sisson, J.C (1985)
Iodine-131 metaiodobenzylguanidine scintigraphy for the location of Neuroblastoma:
Preliminary experience in ten cases
J. Nucl. Med., 26, 736-742
- 59.) Gillies, S.D., Lo, K.M., Wesolowski, J. (1989)
High level expression of chimeric antibodies using adapted cDNA variable region cassettes
J. Immunol. Methods, 125, 191-202
- 60.) Hakomori, S., Kannagi, R. (1983)
Glykosphingolipids as tumour associated and differentiation markers
J. Natl. Cancer Inst., 71, 231-351
- 61.) Handgretinger, R. (1995)
Untersuchung zur Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern beim metastasierenden Neuroblastom
Medizinische Habilitationsschrift der Universität Tübingen
- 62.) Handgretinger, R., Anderson, K., Lang, P., Dopfer, R., Klingebiel, T., Schrappe, M., Reuland, P., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., Niethammer, D. (1995)
A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma
Eur. J. Cancer, 31A, 261-267
- 63.) Handgretinger, R., Bader, P., Dopfer, R., Klingebiel, T., Reuland, P., Treuner, J., Reisfeld, R.A., Niethammer, D. (1992)
A Phase I Study of Neuroblastoma with the Anti-Ganglioside GD2 Antibody 14G2a
Cancer Immunol. Immunother., 35, 199-204

7. Literatur

- 64.) Handgretinger, R., Greil, J., Schumann, U., Lang, P., Gonzales-Ramella, O., Schmidt, I., Fuhrer, R., Niethammer, D., Klingebiel, T. (1997)
Positive selection and transplantation of peripheral CD 32+ progenitor cells: Feasibility and purging efficacy in pediatric patients with neuroblastoma
J. Hematother., 6(3), 235-242
- 65.) Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel, P.G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R.J., Niethammer, D. (2001)
Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+)progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children.
Bone Marrow Transplant, 27(8), 777-783
- 66.) Hann, H.-W. L., Levy, H.M., Evans, A.E. (1980)
Serum ferritin as a guide to therapy in Neuroblastoma
Cancer Res., 40, 1411-1413
- 67.) Hata, Y., Sasaki, F., Naito, H., Takahashi, H., Namieno, T., Uchino, J. (1991)
Late Recurrence of Neuroblastoma
J Pediatr Surg., 26(12), 1417-1419
- 68.) Hayashi, Y., Kanda, N., Inaba, T. (1989)
Cytogenetic findings and prognosis in neuroblastoma with emphasis on marker chromosome 1
Cancer, 63, 126-132
- 69.) Heiner, J.P., Miraldi, F.D., Kalick, S., Makley, J., Smith-Mensah, W.H., Cheung, N.K.Y. (1987)
Localization of GD2 specific monoclonal antibody 3F8 in human Osteosarcomas
Cancer Res., 47, 5377
- 70.) Hellström, I., Hellström, K.E., Pierce, G.E., Bill, H. (1968)
Demonstration of cell-bound and humoral Immunity against neuroblastoma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1231-1238
- 71.) Hildebrandt, H. (1996)
Antigen binding of antiganglioside antibodies in vitro is strongly influenced by the ganglioside composition of the sample.
FEBS Lett., 388(1), 29- 33
- 72.) Hoefnagel, C.A. (1989)
[Pediatric oncology. Medical aspects of I-131-MIBG]
TVZ, 43(8), 245-8

7. Literatur

- 73.) Hoefnagel, C.A., De Kraker, J., Valdés Olmos, R.A., Voûte, P.A. (1994)
131I-MIBG as a first-line treatment in high-risk neuroblastoma patients
Nucl. Med. Com., 15, 712-717
- 74.) Horsmans Y, Desager JP, Harvengt C. (1990)
Sensitivity and specificity of the determination of urinary catecholamines and their acid metabolites in the diagnosis of neuroblastoma in children
Bull Cancer, 77(10), 985-989
- 75.) Imashuku, S., Todo, S., Nakajima, F., Fujita, K., Hibi, S., Miyake, M. (1991)
Treatment for Stage III and IV Neuroblastoma Patients: Initial Response to Chemotherapy Evaluated by Biochemical Parameters
Acta Pediatr. Scand., 80, 924-930
- 76.) Irie, R.F., Matsuki, T., Morton, D.L. (1989)
Human monoclonal antibody to ganglioside GM2 for melanoma treatment.
Lancet, 1(8641), 786-787
- 77.) Ito, T., Griffin, T.W., Collins, J.A., Brill, A.B. (1992)
Intratumoral and whole-body distributions of C110 anti-carcinoembryonic antigen radioimmunotoxin after intraperitoneal and intravenous injection: a quantitative autoradiographic study.
Cancer Res, 52(7), 1961-1967
- 78.) Jaffe, N. (1976)
Neuroblastoma. Review of the Literature and an Examination of Factors contributing to its Enigmatic Character
Cancer Treat. Rep., 3, 61-82
- 79.) Jain, R.K. (1998)
Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors.
J Control Release, 53, 49-67
- 80.) Jerne, N.K. (1974)
Towards a network theory of the immune system
Ann. Immunol. (Paris), 125C(1-2), 373-389
- 81.) Jescke, B.M. (1994)
Behandlung des Neuroblastoms Stadium IV mit dem murinen monoklonalen Antikörper 14G2a oder mit dem chimären monoklonalen Antikörper ch14.18 in Kombination mit dem Wachstumsfaktor GM-CSF
Medizinische Dissertation der Universität Tübingen

7. Literatur

- 82.) Jones, D.H., Lashford, L.S., Dicks-Mireaux, C., Kemshead, J.T. (1987)
Comparison of pharmacokinetics of radiolabeled monoclonal antibody UJ13A
in patients and animal models.
NCI Monogr, (3), 125-30
- 83.) Joppich, R., Hauser, I. (1982)
Urinary prostacyclin and thromboxane A2 metabolites in preterm and full-term
infants in relation to plasma renin activity and blood pressure.
Biol Neonate, 42(3-4), 179-84
- 84.) Kaatsch, P., Haaf, H.G., Michaelis, J. (1994)
Jahresbericht 1993 des Deutschen Kinderkrebsregisters, Mainz
- 85.) Khazaeli, M.B., Saleh, M.N., Liu, T.P., Allen, L., Rogers, K., Wheeler, R.H.,
Reisfeld, R., LoBuglio, A.F. (1991)
Murine and chimeric antibody to GD2 in melanoma patients:
Pharmakokinetics and immune response.
Proceedings of Eighth International Hammersmith Meeting, Porto Carras,
Greece, 1991, 19
- 86.) Khazaeli, M.B., Saleh, M.N., Liu, T.P., Meredith, R.F., Wheeler, R.H., Baker,
T.S., King, D., Secher, D., Allen, L., Rogers, K. et al. (1991)
Pharmacokinetics and immune response of ¹³¹I-chimeric mouse/human
B72.3 (human gamma 4) monoclonal antibody in humans.
Cancer Res, 51(20), 5461-5466
- 87.) Khazaeli, M.B., Saleh, M., Liu, T., Reisfeld, R.A., LoBuglio, A.F. (1991)
Murine and Chimeric Antibodies to GD2 Antigen in Melanoma Patients:
Pharmacokinetics and Immune Response
in: Chapman and Hall: Monoclonal Antibodies: Applications and Clinical
Oncology (zur Publikation angenommen)
- 88.) Kerbl, R., Urban, C.E., Ladenstein, R., Ambros, I.M., Spuller, E., Mutz, I.,
Amann, G., Kovar, H., Gadner, H., Ambros, P.F. (1997)
Neuroblastoma screening in infants postponed after the sixth month of age: a
trial to reduce "overdiagnosis" and to detect cases with "unfavorable" biologic
features.
Med Pediatr Oncol, 29(1), 1-10
- 89.) Klingebiel, T., Feine, U., Treuner, J., Reuland, P., Handgretinger, R.,
Niethammer, D. (1991)
Treatment of neuroblastoma with [¹³¹I]metaiodobenzylguanidine: long-term
results in 25 patients.
J Nucl Biol Med, 35(4), 216-219

7. Literatur

- 90.) Koprowski, H., Herlyn, D., Lubeck, M., DeFreitas, E., Sears, H.F. (1984)
Human anti-idiotypic antibodies in cancer patients: Is the modulation of the
immune response beneficial for the patient?
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 216-219
- 91.) Köhler, G., Milstein, C. (1975)
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature, 256, 495-497
- 92.) Kremens, B., Hero, B., Esser, J., Weinel, P., Filger-Brillinger, J., Fleischhack,
G., Graf, N., Gruttner, H.P., Niemeyer, C., Schulz, A., Wickmann, L., Berthold,
F. (2002)
Ocular symptoms in children treated with human-mouse chimeric anti-GD2
mAb ch14.18 for neuroblastoma.
Cancer Immunol Immunother., 51(2), 107-110
- 93.) Krivit, W., Mirkin, L., Freier, E., Nesbit, M., Coopre, M.J. (1980)
Serum Catecholamine Metabolites in Stage IV Neuroblastoma, 33-42
in: Evans, A.E.: Advances in Neuroblastoma Research, 1980
Raven Press, New York
- 94.) Kushner, B.H., Cheung, N.-K.V. (1988)
Treatment of Neuroblastoma
in: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (eds)
Cancer Updates, Vol. 2, Philadelphia Lippincott
- 95.) Kushner, B.H., Cheung, N.-K.V. (1989)
GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity
against human melanoma and neuroblastoma.
Blood, 73(7), 1936-41
- 96.) Kushner, B.H., Gilbert, F., Helson, L. (1986)
Familial neuroblastoma : Case reports, literature review, and etiologic
considerations
Cancer, 57, 1887-1893
- 97.) Kushner, B.H., Helson, L., Lane, J.M., Hajdu, S. (1986)
Metastatic Neuroblastoma after 52 Years of Apparent Dormancy
N Engl J Med., 315(3), 196-197
- 98.) Kuter, I. (2001)
Breast cancer
Oncologist, 6(4), 338-346

7. Literatur

- 99.) Ladisch, S. (1989)
Tumour Gangliosides: Shedding, Structural Characterization, and Immunosuppressive Activity
in: Oettgen, H.F., Gangliosides and Cancer 1989, 217-229, VCH Verlagsgesellschaft, erste Auflage, Weinheim, Basel, Cambridge, New York
- 100.) Lampert F, Christiansen H, Berner F, Terpe HJ, Berthold F. (1997)
Disseminated neuroblastomas under 1 year of age: cell biology and prognosis.
J Neurooncol., 31(1-2), 181-4
- 101.) Leunig, M., Yuan, F., Menger, M.D., Boucher, Y., Goetz, A.E., Messmer, K., Jain, R.K. (1992)
Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice.
Cancer Res, 52(23), 6553-6560
- 102.) Liippo, K.K., Terho, T. (1991)
Concomitant Monitoring of Serum Neuron-Specific Enolase and Creatine Kinase BB in Small Cell Lung Cancer
Acta Oncol., 30(3), 321-324
- 103.) Lindenmann, J. (1973)
Speculations on idiotypes and homobodies
Ann. Immunol. (Paris), 124, 171-184
- 104.) Liu, A.Y., Robinson, R.R., Murray, D.E., Jeffrey, A.L., Hellstrom, J., Hellstrom, K.E. (1987)
Production of a Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD 20 with potent Fc-Dependent Biologic Activity
J of Immunol, 139(10), 3521-3526
- 105.) Livingston, R.B., Esteva, F.J. (2001)
Chemotherapy and herceptin for her-2(+) metastatic breast cancer: the best drug?
Oncologist, 6(4), 315-316
- 106.) LoBuglio, A.F., Liu, T., Khazaeli, M.B. (1991)
Human and Chimeric Mouse/Human Monoclonal Antibodies
In: Protein Therapeutics: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics (zur Publikation angenommen)

7. Literatur

- 107.) LoBuglio, A.F., Wheeler, R.H., Trang, J., Haynes, A., Rogers, K., Harvey E.B., Sun, L., Ghrayeb, J., Khazaeli, M.B. (1989)
Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: Kinetics and immune response
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 4220-4224
- 108.) Lode, H.N., Xiang, R., Dreier, T., Varki, N.M., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A. (1998)
Natural killer cell-mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleucin-2 therapy
Blood, 91, 1706-1715
- 109.) Lode, H.N., Xiang, R., Varki, N.M., Dolman, C.S., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A. (1997)
Targeted interleucin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow
J. Natl. Cancer Inst., 89, 1586-1594
- 110.) Lopez, R., Karakousis, C., Rao, U. (1980)
Treatment of Adult Neuroblastoma
Cancer, 45, 840-844
- 111.) Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.M., Dallaire, B.K., Wey, K., Royston, I., Davis, T., Levy, R. (1997)
IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma
Blood, 90(6), 2188-2195
- 112.) Maloney, D.G., Liles, T.M., Czerwinski, D.K., Waldichuk, C., Rosenberg, J., Grillo-Lopez, A., Levy, R. (1994)
Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma
Blood, 84(8), 2457-2466
- 113.) Mancini, A.F., Rosito, P., Faldella, G., Serra, L., Vallicelli, R., Vecchi, V., Vivarelli, F., Paolucci, G. (1982)
Neuroblastoma in a pair of identical twins
Med Pediatr Oncol., 10, 45-51

7. Literatur

- 114.)Marangos, P.J., Schmechel, D., Parma, A.M., Clark, R.L., Goodwin, F.K. (1979)
Measurement of Neuron-Specific (NSE) and Non-Neuronal (NNE) Isoenzymes of Enolase in Rat, Monkey and Human Nervous Tissue
J. Neurochem., 33, 319-329
- 115.)Matthay, K.K., O'Leary, M.C., Ramsay, N.K., Villablanca, J., Reynolds, C.P., Atkinson, J.B., Haase, G.M., Stram, D.O., Seeger, R.C. (1995)
Role of myeloablative therapy in improved outcome for high risk neuroblastoma: review of recent Children's Cancer Group results.
Eur J Cancer, 31A(4), 572-575
- 116.)Mathieu, P., Frappaz, D., Chauvin, F., Combaret, V., Vercherat, M., Brunat-Mentigny, M., David, L., Esteve, J., Favrot, M., Fouillat, V., Greffe, J., Lasset, C., Renaud, P., Philip, T. (1996)
A 5-year (1990-1994) neuroblastoma screening feasibility study in France. Methodology and preliminary observations.
Early Hum Dev., 46(1-2), 177-196
- 117.)McLaughlin, P., Grillo-Lopez, A.J., Link, B.K., Levy, R., Czuczman, M.S., Williams, M.E., Heyman, M.R., Bence-Bruckler, I., White, C.A., Cabanillas, F., Jain, V., Ho, A.D., Lister, J., Wey, K., Shen, D., Dallaire, B.K. (1998)
Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program
J Clin Oncol., 16(8), 2825-2833
- 118.)Miceli, A., Nespoli, L., Burgio, G.R., Aprile, C., Carena, M., Saponaro, R. (1986)
The role of meta-iodo [¹³¹I]benzylguanidine (MIBG) in the diagnosis and follow-up of neuroblastoma.
Pediatr Hematol Oncol., 3(1), 37-47.
- 119.)Miller, R.A., Oseroff, A.R., Stratte, R.T., Levy, R. (1983)
Monoclonal antibody therapeutic trials in seven patients with T-cell lymphoma
Blood, 62, 988-995
- 120.)Mir, R., Phillips, S.L., Schwartz, G., Mathur, R., Khan, A., Kahn, L.B. (1987)
Metastatic Neuroblastoma after 52 Years of Dormancy
Cancer, 60, 2510-2514
- 121.)Miraldi, F.D., Nelson, A.D., Kraly, C., Ellery, S., Landmeier, B., Coccia, P.F., Strandjord, S.E., Cheung, N.-K.V (1986)
Diagnostic Imaging of Human Neuroblastoma with Radiolabeled Antibody.
Radiology, 161(2), 413-418

7. Literatur

- 122.)Morell, A., Terry, W.D., Waldmann, T.A. (1970)
Metabolic properties of IgG subclasses in man.
J Clin Invest., 49(4), 673-680
- 123.)Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., Oi, V.T. (1984)
Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with
human constant region domains.
Proc Natl Acad Sci U S A, 81(21), 6851-6855
- 124.)Morrison, S.L., Oi, V.T. (1989)
Genetically engineered antibody molecules
Adv. Immunol., 44, 65-92
- 125.)Mueller, B.M., Romerdahl, C.A., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A. (1990)
Enhancement of Antibody-Dependent Cytotoxicity with a Chimeric Anti-GD2
Antibody
Journal of Immunology 144, 1382-1386
- 126.)Mujoo, K., Cheresh, D.A., Yang, H.M., Reisfeld, R.A. (1987)
Disialoganglioside GD2 on Human Neuroblastoma Cells: Target Antigen for
Monoclonal Antibody-mediated Cytolysis and Suppression of Tumour Growth
Cancer Research 47, 1098-1104
- 127.)Mujoo, K., Kipps, T.J., Cheresh, D.A., Wargalla, U., Sander, D.J.,Reisfeld,
R.A. (1989)
Functional properties and effect on growth suppression of human
Neuroblastoma tumours by isotype switch variants of monoclonal
antiganglioside GD2 antibody ch14.18
Cancer Res., 49, 2857-2861
- 128.)Munn, D.H., Cordon-Cardo, C., Yeh, S.D.J., Kushner, B.H., Cheung, N.-K.V.
(1989)
Therapy of Neuroblastoma with GD2 Specific Monoclonal Antibody 3F8
In: Oettgen, H.F.: Gangliosides and Cancer, 1989, 261-271
VCH Verlagsgesellschaft, erste Auflage, Weinheim, Basel, Cambridge, New
York
- 129.)Murray, J.L., Cunningham, J.E., Brewer, H., Mujoo, K., Zukiwski, A.A.,
Podoloff, D.A., Kasi, L.P., Bhadkamkar, V., Fritsche, H.A., Benjamin, R.S., et
al. (1994)
Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged
intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors.
J Clin Oncol., 12(1), 184-193

7. Literatur

- 130.) Murray, J.L., Kleinerman, E.S., Jia, S.F., Rosenblum, M.G., Eton, O., Buzaid, A., Legha, S., Ross, M.I., Thompson, L., Mujoo, K., Rieger, P.T., Saleh, M., Khazaeli, M.B., Vadhan-Raj, S. (1996)
Phase Ia/Ib trial of anti-GD2 chimeric monoclonal antibody 14.18 (ch14.18) and recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) in metastatic melanoma
J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol., 19, 206-217
- 131.) Nishi, M., Miyake, H., Takeda, T., Takasugi, N., Hanai, J., Kawai, T. (1991)
Mass screening for neuroblastoma and estimation of costs.
Acta Paediatr Scand., 80(8-9), 812-817
- 132.) Oezkaynak, M.F., Sondel, P.M., Krailo, M.D., Gan, J., Javorsky, B., Reisfeld, R.A., Matthay, K.K., Reaman, G.H., Seeger, R.C. (2000)
Phase I Study of Chimeric Human/Murine Anti-Ganglioside GD2 Monoclonal Antibody (ch14.18) With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Children With Neuroblastoma Immediately After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation: A children`s Cancer Group Study
J. Clin. Oncol., 18, 4077-4085
- 133.) Ollert, M.W., David, K., Schmitt, C., Hauenschild, A., Bredehorst, R., Erttmann, R., Vogel, C.W. (1996)
Normal human Serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human natural IgM
Eur. J. Cancer, 33, 1942-1948
- 134.) Ollert, M.W., David, K., Vollmert, C., Juhl, H., Erttmnn, R., Bredehorst, R., Vogel, C.W. (1997)
Mechanisms of in vivo anti-neuroblastoma activity of human natural IgM
Eur. J. Cancer, 33, 1942.1948
- 135.) Oratz, R., Speyer, J.L., Wernz, J.C., Hoehster, H., Meyers, M., Mischak, R., Spitler, L.E. (1990)
Antimelanoma monoclonal antibody-ricin A chain immunoconjugate (XMMME-001-RTA) plus cyclophosphamide in the treatment of metastatic malignant melanoma: results of a phase II trial
J. Biol. Response Mod., 9, 345-354
- 136.) Pai, L.H., FitzGerald, D.J., Tepper, M., Schacter, B., Spitalny, G., Pastan, I. (1990)
Inhibition of antibody response to Pseudomonas exotoxin and an immunotoxin containing Pseudomonas exotoxin by 15-deoxyspergualin in mice
Cancer Res. 50, 7750-7753

7. Literatur

- 137.)Pancook, J.D., Becker, J.C., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A. (1996)
Eradication of established hepatic human neuroblastoma metastases in mice with severe combined immunodeficiency by antibody-targeted interleukin-2.
Cancer Immunol Immunother., 42(2), 88-92
- 138.)Philip, T., Bernard, J.L., Zucker, J.M., Lutz, P., Bordigoni, P., Plouvier, E., Robert, A., Pinkerton, R., Philippe, N. (1987)
High-dose chemotherapy with bone marrow transplantation consolidation treatment in neuroblastoma: an unselected group of stage IV patients over 1 year of age
J. Clin. Oncol., 5, 266-271
- 139.)Philip, T., Zucker, J.M., Bernard, J.L., Lutz, P., Bordigoni, P., Plouvier, E., Robert, A., Roché, H., Soulliet, G., Bouffet, E., Michon, J., Lopez, M., Vilcoq, J.M., Gentet, J.C., Philip, I., Ladenstein, R., Favrot, M., Chauvin, F. (1991)
Improved Survival at two and five Years in the LMCE1 Unselected Group of 72 Children with Stage IV Neuroblastoma Older Than One Year of Age at Diagnosis: Is Cure Possible in a Small Subgroup?
J. Clin. Oncol., 9, 1037-1044
- 140.)Pimm, M.V., Perkins, A.C., Armitage, N.C., Baldwin, R.W. (1985)
Localization of anti-osteogenic sarcoma monoclonal antibody 791T/36 in a primary human osteogenic sarcoma and its subsequent xenograft in immunodeprived mice.
Cancer Immunol Immunother., 19(1), 18-21
- 141.)Pole, J.G., Casper, J., Elfenbein, G., Gee, A., Gross, S., Janssen, W., Koch, P., Marcus, R., Pick, T., Shuster, J., et al. (1991)
High-dose chemoradiotherapy supported by marrow infusions for advanced neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study.
J Clin Oncol., 9(1), 152-158
- 142.)Ponzoni, M., Casalaro, A., Lanciotti, M., Montaldo, P.G., Coruglia-Ferraris, P. (1992)
The combination of gamma interferon and tumour necrosis factor causes a rapid and extensive differentiation of human Neuroblastoma cells
Cancer Res., 52, 931-939
- 143.)Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch
259. Auflage (2001)
W. de Gruyter Verlag, berlin, New York

7. Literatur

- 144.)Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A, Hanna, N., Anderson, D.R. (1994)
Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD 20
Blood, 83, 435-445
- 145.)Reisfeld, R.A., Cheresh, D.A. (1987)
Human Tumour Antigens
Adv Immunol., 40, 323-377
- 146.)Reuland, P. (1991)
Nuklearmedizinische Untersuchungen bei embryonalen Tumoren.
Tübingen, Germany: Universität Tübingen
- 147.) Reuland, P., Geiger, L., Thelen, M.H., Handgretinger, R., Haase, B., Muller-Schauenburg, W., Niethammer, D., Bares, R. (2001)
Follow-up in neuroblastoma: comparison of metaiodobenzylguanidine and a chimeric anti-GD2 antibody for detection of tumor relapse and therapy response.
J Pediatr Hematol Oncol., 23(7), 437-442
- 148.)Roberts, S., Cheetham, J.C., Rees, A.R. (1987)
Generation of an antibody with enhanced affinity and specificity for its antigen by protein engineering
Nature, 328, 731-734
- 149.)Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D. (1987)
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Thieme, Stuttgart, New York
- 150.)Sabzevari, H., Gillies, S.D., Mueller, B.M., Pancook, J.D., Reisfeld, R.A. (1994)
A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice.
Proc Natl Acad Sci U S A, 91(20), 9626-9630
- 151.)Sacchi, S., Federico, M., Dastoli, G., Fiorani, C., Vinci, G., Clo, V., Casolari, B. (2001)
Treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with anti CD 20 monoclonal antibody Rituximab
Crit Rev Oncol Hematol., 37(1), 13-25

7. Literatur

- 152.) Saito, M., Yu, R.K., Cheung N.-K.V. (1985)
Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human Neuroblastoma cells
Biochem. Biophys. Res. Comm., 127, 1
- 153.) Saleh, M.N., Khazaeli, M.B., Wheeler, R.H., Allen, L., Tilden, A.B., Grizzle, W., Reisfeld, R.A., Yu, A.L., Gillies, S.D., LoBuglio, A.F. (1992)
Phase I trial of the chimeric anti-GD2 monoclonal antibody ch14.18 in patients with malignant melanoma.
Hum Antibodies Hybridomas, 3(1): 19-24
- 154.) Saleh, M.N., Khazaeli, M.B., Wheeler, R.H., Dropcho, E., Liu, T., Urist, M., Miller, D.M., Lawson, S., Dixon, P., Russell, C.H., LoBuglio, A.F. (1992)
Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma.
Cancer Res., 52(16), 4342-4347
- 155.) Schilling FH, Berthold F, Erttmann R, Michaelis J, Spix C, Sander J, Schwarz K, Treuner J. (2000)
Population-based and controlled study to evaluate neuroblastoma screening at one year of age in Germany: interim results.
Med Pediatr Oncol., 35(6), 701-704
- 156.) Schleiermacher, G., Delattre, O., Peter, M., Mosseri, V., Delonlay, P., Vielh, P., Thomas, G., Zucker, J.M., Magdelenat, H., Michon, J. (1996)
Clinical relevance of loss heterozygosity of the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma: a single-institution study.
Int J Cancer, 69(2), 73-78
- 157.) Schmidt, M.L., Lukens, J.N., Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Shimada, H., Gerbing, R.B., Stram, D.O., Perez, C., Haase, G.M., Matthay, K.K. (2000)
Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: A prospective Children's Cancer Group study.
J Clin Oncol., 18(6), 1260-1268
- 158.) Schroff, R.W., Foon, K.A., Beatty, S.M., Oldham, R.K., Morgan, A.C. Jr. (1985)
Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy.
Cancer Res., 45(2), 879-885

7. Literatur

- 159.)Schulz, G., Cheresch, D.A., Varki, N.B., Yu, A., Staffileno, L.K., Reisfeld, R.A. (1984)
Detection of Ganglioside GD2 in Tumour Tissues and Sera of Neuroblastoma Patients
Cancer Res., 44, 5914-5920
- 160.)Schwab, M., Amler, L.C. (1990)
Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer
Genes Chromosomes Cancer, 1(3), 181-193
- 161.)Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, W.E., Wong, K.Y., Hammond, D., (1985)
Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas
N. Engl. J. Med., 313, 1111-1116
- 162.)Shawler, P.L., Bartholomew, R.M., Smith, L.M., Dillman, R.O. (1985)
Human Immune Response to multiple injections of murine monoclonal immunoglobulins
J. Immunol., 135, 1530-1537
- 163.)Shiloni, E., Eisenthal, A., Sachs, D., Rosenberg, S.A. (1987)
Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by murine lymphocytes activated in recombinant interleukin 2.
J Immunol, 138(6), 1992-1998
- 164.)Shuster, J.J., McWilliams, N.B., Castleberry, R., Nitschke, R., Smith, E.I., Altshuler, G., Kun, L., Brodeur, G., Joski, V., Vietti, T. (1992)
Serum lactate dehydrogenase in childhood neuroblastoma. A Pediatric Oncology Group recursive partitioning study
Am. J. Clin. Oncol., 15, 295-303
- 165.)Siegel, S.E., Laug, W.E., W.E., Harlow, P.J., Shaw, K.N.F., Labding, B., Gutenstein, M. (1980)
Patterns of Urinary Catecholamine Metabolite Excretion in Neuroblastoma, 25-32
in : Evans, A.E.: Advances in Neuroblastoma Research, 1980
Raven Press, New York
- 166.) Siegler, R.L., Walker, M.B., Crouch, R.H., Christenson, P., Jubiz, W. 1977
Plasma prostaglandin E concentrations from birth through childhood.
J Pediatr., 91(5), 734-7

7. Literatur

- 167.) Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L. (2001)
Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2
N Engl J Med., 344(11), 783-792
- 168.) Stram, D.O., Matthay, K.K., O'Leary, M., Reynolds, C.P., Haase, G.M., Atkinson, J.B., Brodeur, G.M., Seeger, R.C. (1996)
Consolidation chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation versus continued chemotherapy for metastatic neuroblastoma: a report of two concurrent Children's Cancer Group studies.
J Clin Oncol., 14(9), 2417-2426
- 169.) Suarez, A., Hartmann, O., Vassal, G., Giron, A., Habrand, G., Valteau, D., Brugieres, L., Kalifa, C., Lemerle, J. (1991)
Treatment of Stage IV-S Neuroblastoma: A study of 34 Cases Treated Between 1982 and 1987
Med Pediatr Oncol., 19(6), 473-477
- 170.) Svennerholm, L., Bostrom, K., Fredman, P., Jungbjer, B., Lekman, A., Mansson, J.E., Rynmark, B.M. (1994)
Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord.
Biochim Biophys Acta, 1214(2), 115-23
- 171.) Trail, P.A., Bianchi, A.B. (1999)
Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer.
Curr Opin Immunol., 11(5), 584-588
- 172.) Treuner J, Feine U, Niethammer D, Muller-Schaumburg W, Meinke J, Eibach E, Dopfer R, Klingebiel T, Grumbach S. (1984)
Scintigraphic imaging of neuroblastoma with [131-I]iodobenzylguanidine.
Lancet, 1(8372), 333-334
- 173.) Treuner, J., Gerein, V., Klingebiel, T., Schwabe, D., Feine, U., Happ, J., Niethammer, D., Maul, F., Dopfer, R., Kornhuber, B., Berthold, F., Jürgens, H., Hör, G. (1988)
MIBG-treatment in neuroblastoma: experiences of the Tübingen/Frankfurt group, 669
in: Evans, A.E., D'Angio, G., Seeger (eds),
Advances of neuroblastoma research

7. Literatur

- 174.)Treuner, J., Schilling, F.H. (1995)
Neuroblastoma mass screening: the arguments for and against.
Eur J Cancer, 31A(4), 565-568
- 175.)Triche, T.J., Askin, F.B (1983)
Neuroblastoma and the differential diagnosis of small-, round-, blue-cell tumours
Hum Pathol., 14(7), 569-595
- 176.)Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S., Reisfeld, R.A., Yu, A.L. (1995)
Pharmacokinetics of anti-ganglioside GD2 mAb 14G2a in a phase I trial in pediatric cancer patients.
Cancer Immunol Immunother., 41(1), 29-36
- 177.)Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S., Yu, A.L. (1995)
Pharmacokinetics of human-mouse chimeric anti-GD2 mAb in a phase I trial in neuroblastoma patients
Cancer Immunol. Immunother., 41, 331-338
- 178.)Vadhan-Raj, S., Cordon-Cardo, C., Carswell, E., Mintzer, D., Dantis, L., Duteau, C., Templeton, M.A., Oettgen, H.F., Old, L.J., Houghton, A.N. (1988)
Phase I trial of a mouse monoclonal antibody against GD3 ganglioside in patients with melanoma: induction of inflammatory responses at tumor sites.
J Clin Oncol., 6(10), 1636-1648
- 179.)Vincent, T., De Vita, J., Hellman, S.
Neuroblastoma
Cancer, 3d Edition
- 180.)Vincenti, F. (2001)
The role of newer monoclonal antibodies in renal transplantation
Transplant Proc., 33(1-2), 1000-1001
- 181.)Voûte, P.A., Hoefnagel, C.A., Marcuse, H.R. (1985)
Detection of Neuroblastoma with 131I - metaiodobenzylguanidine
Prog. Clin. Biol. Res., 175, 389-398
- 182.)Voûte, P.A., Kraker, J.de, Burgers, J.M.V. (1986)
Tumours of the Sympathetic Nervous System
Neuroblastoma, Ganglioneuroma, Pheochromocytoma, 238-251
In: Voûte, P.A., Barret, A., Bloom, H.G.J., Lemerk, J., Neidhardt, M.K. (eds)
Cancer in Children—Clinical Management, second revised edition
UICC International Union against Cancer

7. Literatur

- 183.) Waldmann, T.A., Schwab, P.J. (1965)
IgG (7 S Gamma Globulin) Metabolism in Hypogammaglobulinemia. Studies in Patients with Defective Gamma Globulin Synthesis, Gastrointestinal Protein Loss or both
J. Clin. Invest., 44, 1523-1533
- 184.) Watanabe, Y., Endo, K., Koizumi, M., Kawamura, Y., Saga, T., Sakahara, H., Kuroki, M., Matsuoka, Y., Konishi, J. (1989)
Effect of tumor mass and antigenic nature on the biodistribution of labeled monoclonal antibodies in mice.
Cancer Res., 49(11), 2884-2889
- 185.) Woods, W.G., Tuchman, M., Robison, L.L., Bernstein, M., Leclerc, J.M., Brisson, L.C., Brossard, J., Hill, G., Shuster, J., Luepker, R., Byrne, T., Weitzman, S., Bunin, G., Lemieux, B., Brodeur, G.M. (1997)
Screening for neuroblastoma is ineffective in reducing the incidence of unfavourable advanced stage disease in older children.
Eur J Cancer, 33(12), 2106-2112
- 186.) Wu, Z.L., Schwartz, E., Seeger, R., Ladisch, S. (1986)
Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas.
Cancer Res., 46(1), 440-443
- 187.) Yates, A.J., Thompson, D.K., Boesel, C.P., Albrightson, C., Hart, R.W. (1979)
Lipid composition of human neural tumours
J. Lipid Res., 20, 428-436
- 188.) Yu, A.L., Reisfeld, R.A., Gillies, S.D. (1991)
Immune response to monoclonal anti-GD2 antibody therapy.
Proc Am Assoc Cancer Res., 32, 263
- 189.) Yu, A.L., Uttenreuther-Fischer, M.M., Huang, C.S., Tsui, C.C., Gillies, S.D., Reisfeld, R.A., Kung, F.H. (1998)
Phase I trial of a human-mouse chimeric anti-disialoganglioside monoclonal antibody ch14.18 in patients with refractory neuroblastoma and osteosarcoma
J. Clin. Oncol., 16, 2169-2180
- 190.) Zeltzer, P.M., Marangos, P.J., Evans, A.E., Schneider, L.S. (1987)
Serum neuron-specific enolase in children with neuroblastoma.
Relationship to stage and disease course
Cancer, 57, 1230-1234

8. Abkürzungsverzeichnis

ADDC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AK	Antikörper
APUD	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	Komplementabhängige Zytotoxizität
CDR	Complementarity determining regions
CT	Computertomographie
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GD2	Oberflächenantigen „Gangliosid 2“
GM- CSF	Granulozyten- Makrophagen- Kolonie stimulierender Faktor
HACA	Humanes Anti- Chimär- Antikörper
HAMA	Humanes Anti- Maus- Antikörper
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HVA	Homovanillinsäure
HWZ	Halbwertszeit
Ig	Immunglobulin
IL2	Interleukin 2
KMT	Knochenmarkstransplantation
LDH	Lactatdehydrogenase
MIBG	Meta- Jodo- Benzyl- Guanidin
NB 97	Neuroblastomstudie 1997 der GPO
NK- Zellen	Natürliche Killerzellen
N(M)R	nuclear (magnetic) resonance = Kernspinresonanz
N- myc	Onkogen
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OPD	o- Phenyldiamine
PBS	Phosphatpuffer
RIA	Radioimmunassay
VMA	Vanillinmandelsäure

9. Tabellenverzeichnis

HACA- Werte des 1. Patientenkollektivs

Tag der Abnahme	am 1.Tag vor dem 1.Zyklus		Am 1.Tag vor dem 2.Zyklus		am 1.Tag vor dem 3.Zyklus		Am 1.Tag vor dem 4.Zyklus		Am 1.Tag vor dem 5.Zyklus		Am 1.Tag vor dem 6.Zyklus		am 1.Tag vor dem 7.Zyklus	
	Patient Nr.	absolut in ng/ml	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut
1	132	1	100	0,8	116	0,9								
2	1520	1	1744	1,1	4280	2,8								
3	800	1	3600	4,5	4400	5,5								
4	1320	1	1880	1,4	2770	2,1								
5	1520	1	1680	1,1	2430	1,6								
6	3760	1	6000	1,6	9020	2,4								
7	3680	1	9920	2,7	9920	2,7								
8	4000	1	2800	0,7										
9	2400	1	3800	1,6										
10	4000	1	16480	4,1	21120	5,3	27200	0,8						
11	4400	1	5200	1,2	5200	1,2	9240	1	9680	1,1				

9. Tabellenverzeichnis

12	1600	1	1480	0,9	1600	1	3200	2	3200	2				
13	1600	1	4320	2,7	7440	4,7	403200	250	1110000	690				
14	3680	1	4780	1,3	5150	0,4	5150	0,4	8460	0,3				
15	2048	1	1840	0,9	1040	0,5	1744	0,9	3070	0,5				
16	176	1	1012	5,8	907	5,2	1020	5,8	1100	3,2				
17	880	1	1400	1,6	1670	1,9	1600	1,8	2000	2,3	3430	1,9		
18	2035	1	7320	3,6	9160	4,5	12000	5,9	16800	8,3	17700	1,7		
19	5480	1	1644	0,3	548	0,1	3680	0,7	1680	0,3	2960	0,5		
20	1040	1	432	0,4	464	0,4	720	0,7	480	0,5	448	0,4		
21	378	1	719	1,9	1040	2,8	980	12,6	960	2,5	848	2,2		
22	2035	1	2650	1,3	1830	0,9	2157	1,1	9398	4,6	61416	30,2		
23	381	1	656	1,7	570	0,5	610	0,6	880	1,3	880	1,3		
24	2035	1	2035	1	2240	1,1	2650	0,3	2850	0,4	2440	0,2		
25	316	1	201	0,6	249	0,8	28440	90	83200	260	124800	390		
26	2035	1	2240	1,1	2650	1,3	2240	1,1	2440	1,2	2850	1,4		
27	42	1	4000	100	20160	480	281400	6700	441000	10500	386400	3200	420000	1000
28	68	1	564	8,3	3640	54								

9. Tabellenverzeichnis

29	84	1	113	1,3	1054	12,6	1970	23,5						
30	118	1	111	0,9	135	1,1	141	1,2						
31	70	1	18115	260	66040	940	26800	380						
32	49	1	12200	250	115000	2300	101000	2100	103880	2120				
33	36	1	125	3,5	133	3,7	145	4	204	5,7				
34	26	1	38	1,5	32	1,2	57	2,2	70	2,7	102	3,9		
35	12	1	4200	350	75500	6290	82800	6900	94000	7800	81000	6750		
36	56	1	86	1,5	78	1,4	61	1,1	95	1,7	5040	9136		
37	27	1	13	0,5	35	1,3	82	3	86	3,2	93	3,4		
38	49	1	31	0,6	71	1,4	83	1,7	123	2,5	182	3,7		
39	39	1	35	0,9	27	0,7	31	0,8	86	0,2	257	6,6		
40	49	1	1754	36	17150	350	58800	1200	107000	2200	126000	2600		
41	34	1	40	1,2	35	1	48	0,4	194	5,7	222	6,5		
42	15	1	36	2,4	36	2,4	20	0,3	38	1,1	153	10,2		

Tab.1: HACA- Werte des 1. Patientenkollektivs, die wie oben erwähnt mit 5 Tagen pro Zyklus behandelt wurden, absolut in ng/ ml und relativ als x- facher Nullwert.

9. Tabellenverzeichnis

HACA- Werte des 2. Patientenkollektivs

Tag der Abnahme	am 1.Tag vor dem 1.Zyklus		am 1.Tag vor dem 2.Zyklus		am 1.Tag vor dem 3.Zyklus	
	absolut	relativ	absolut	relativ	absolut	relativ
43	2360	1	11330	4,8		
44	1400	1	3240	2,3		
45	4000	1	15200	3,8		
46	2080	1	5200	2,5	7280	3,5
47	640	1	920	1,4	2640	4,4
48	1320	1	1720	1,3	1980	1,5
49	720	1	2300	3,2		
50	1080	1	4540	4,2		
51	1120	1	4260	3,8		
52	1400	1	1200	0,9	1600	1,1
53	5040	1	20800	4,1	22800	4,5
54	3920	1	14900	3,8	15700	4
55	3760	1	4000	1,1		

Tab.2: HACA- Werte des 2. Patientenkollektivs, also der 10 Tage pro Zyklus behandelten Patienten absolut in ng/ml und relativ als x- facher Nullwert.

9. Tabellenverzeichnis

„5- Tage- Behandlungsgruppe“

1.Zyklus

Abnahme – Zeitpunkt	TAG 1													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
1	320	1	13700	42,8	6400	20,0	8000	25,0	8200	25,6	6000	18,8	2900	9,1
2	250	1	9700	38,8	13500	54,0	8700	34,8	6300	25,2	2000	8,0	2700	10,8
3	50	1												
4	108	1	6000	55,6	4630	42,9	3680	34,1	2690	24,9	2310	21,4	1850	17,1
5	240	1	7640	31,8	3720	15,5	1990	8,3	1100	4,6	2200	9,2		
6	164	1	9850	60,1	6380	38,9	1240	7,6	2260	13,8	3280	20,0	590	3,6
7	102	1	7960	78,0	7940	77,8	13600	133,3	6500	63,7				
8														
9	600	1	7350	12,3	6760	11,3	6980	11,6	7620	12,7	6310	10,5	3050	5,1
Durchsch.	229													

9. Tabellenverzeichnis

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 5													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
1	8900	1	16700	1,9	15700	1,8	13700	1,5	14100	1,6	13850	1,6	10000	1,1
2	7800	1	19000	2,4	18000	2,3			17800	2,3	17000	2,2	6000	0,8
3	14730	1	22110	1,5	16420	1,1	16620	1,1	12560	0,9	7390	0,5	4520	0,3
4	2920	1	8150	2,8	6060	2,1	4790	1,6	2750	0,9	2610	0,9	2230	0,8
5	7900	1	28520	3,6	17840	2,3	15330	1,9	8050	1	11740	1,5	6200	0,8
6														
7	14680	1	15330	1	18270	1,2	16320	1,1	12950	0,9	12730	0,9	11740	0,8
8														
9														
Durchsch.	9488													

9. Tabellenverzeichnis

2.Zyklus

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 1													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
1														
2	400	1	14000	35,5	20200	50,5	13400	33,5	10900	27,3	5700	14,3	3800	9,5
3	120	1	5030	41,9	2150	17,9	3110	25,9	1960	16,3	1800	15,0	1730	14,4
4	320	1	5690	17,8	6130	19,2			6730	21,0	5830	18,2		
5														
6	204	1	4700	23,0	1450	7,1	4130	20,2	1510	7,4	3230	15,8	2130	10,4
7	204	1	10820	53,0	11040	54,1	4250	20,8	8510	41,7	8050	39,5	2960	14,5
8	50	1	760	15,2	7170	143,4	1610	32,2	1580	31,6	930	18,6	1100	22,0
9	204	1	8920	43,7	8870	43,5	7910	38,8	8260	40,5	8680	42,5	5440	26,7
Durchsch.	215													

9. Tabellenverzeichnis

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 5													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
1														
2	3200	1	22570	7,1	10900	3,4	10900	3,4	8100	2,5	7700	2,4	6000	1,9
3	5130	1	7160	1,4	9100	1,8	8890	1,7	7960	1,5	5490	1,1	4800	0,9
4	6370	1	19100	3,0	13830	2,2	9550	1,5	13490	2,1	12250	1,9	7360	1,2
5	6240	1	21500	3,4			19680	3,2	19320	3,1	14760	2,4	12170	2,0
6														
7	3530	1	15570	4,4	6440	1,8	13770	3,9	15000	4,2	11520	3,3	8620	2,4
8														
9	9240	1	8840	1			16360	1,8	8330	0,9	7420	0,8	7640	0,8
Durchsch.	5618													

9. Tabellenverzeichnis

3.Zyklus

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 1													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
1	80	1	20200	252,8	15200	190	10000	125	7400	92,5	8800	110	5900	73,8
2	204	1	8160	40,0	8220	40,3	10000	49,0	11000	53,9	14100	69,1		
3	67	1	6360	94,9	4370	65,2	5490	81,9			4880	72,8	3540	5208
4	30	1	9600	18,1	9170	17,3	8730	16,5	5820	11,0	6100	11,5	4830	9,1
5	77	1	12780	165	16130	20,9	12020	156,1	7000	90,9	5740	74,5	2120	27,5
6														
7														
8														
9														
Durchsch.	92													

9. Tabellenverzeichnis

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 5													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
1														
2	6740	1	8450	1,3			20200	3,0	7700	1,1	6600	1,0	6000	0,9
3	6550	1	7180	1,1	7840	1,2	8180	1,2	3880	0,6	3830	0,6	3230	0,5
4	7180	1	15900	2,2	9000	1,3	8820	1,2	7900	1,1	6320	0,9	6130	0,9
5	9200	1	23640	2,6			24670	2,7	26500	2,9	13030	1,4	15800	1,7
6														
7														
8														
9														
Durchsch.	7418													

Tab. 7: ch14.18 Titer bei Patienten mit 5 Tagen pro Behandlungsblock absolut in ng/ml und relativ als x- facher Nullwert getrennt nach Zyklen und Behandlungstag.

9. Tabellenverzeichnis

„10- Tage- Behandlungsgruppe“

1.Zyklus

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 1													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
10	200	1			18120	90,6	18940	94,7	16560	82,8	15530	77,7		
11	400	1	18900	47,3	18770	46,9	16970	42,4	16630	41,6	15460	38,7	16550	41,4
12	4000	1	2753	0,7	2390	0,6	1981	0,5	1972	0,5	1963	0,5	1585	0,4
13	1130	1	54600	48,3	74300	65,8	63200	55,9	60500	53,5	34000	30,1		
14	4340	1	13740	3,2	21030	4,8	20820	4,8	19000	4,4	19870	4,6	17100	3,9
15	160	1	1430	8,9	2530	15,8	2290	14,3	2150	13,4	1580	9,9	1350	8,4
16														
17	1016	1	11180	11	12240	12	8130	8,1	5780	5,8	5010	5	4320	4,3
18	120	1	3820	31,8	5260	43,8	5100	42,5	4900	40,8	1410	11,8		
19														
20	770	1	31000	4,3	32980	42,8	23930	31,1	21540	28,0	16180	21,0	17730	23,0
21	1330	1	9310	7,0	8820	6,6	7510	5,6	5890	4,4	4710	3,5	3350	2,5
22	930	1	15400	16,6	19830	21,3	17320	18,6	15130	16,3	11530	12,4	8280	8,9
Durchsch.	1309													

9. Tabellenverzeichnis

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 10													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
10	18070	1	23130	1,3	25100	1,4	19870	1,1	19540	1,1	21340	1,2	20570	1,1
11	26160	1	43300	1,7	42860	1,6	46490	1,8	46330	1,8	55630	2,1	39450	1,5
12	13230	1	25730	1,9	13900	1,1	15070	1,1	16470	1,2	17220	1,3	12450	0,9
13	71500	1	79500	1,1	90300	1,3	81900	1,1	78800	1,1	78900	1,1	75400	1,1
14	20870	1	20930	1,0	21580	1,0	20110	1,0	20290	1,0	20200	1,0	21690	1,0
15	1740	1	5530	3,2	2010	1,2	3410	2,0	2140	1,2	1880	1,1	1230	0,7
16	2770	1					4800	1,7	5500	2,0	3530	1,3	2880	1,0
17	9600	1			10180	1,1			17280	1,8			10560	1,1
18	24530	1	28610	1,2	33340	1,4	26560	1,1	26680	1,1	21350	0,9	19530	0,8
19														
20	13520	1	39740	2,9	30740	2,3	22510	1,7	14200	1,1	13210	1,0	19240	1,4
21	4140	1	4010	1,0	6470	1,6	4900	1,2	3190	0,8	2850	0,7	3260	0,8
22	2700	1	10550	3,9	13690	5,1	17670	6,5	24390	9,0	12140	4,5	12370	4,6
Durchsch.	17403													

9. Tabellenverzeichnis

2.Zyklus

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 1													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
10														
11														
12	3500	1	10500	3,0	5500	1,6			3800	1,1	3050	0,9	7100	2,0
13	1600	1	83000	51,9	70800	44,3	71000	44,4	59700	37,3			51100	31,9
14	4170	1	17220	4,1	25250	6,1	18210	4,4	19240	4,6	18060	4,3	17890	4,3
15	780	1	1120	1,4	1280	1,6	1580	2,0	1040	1,3	820	1,1	760	1,0
16														
17														
18														
19	3300	1			14510	4,4	21590	6,5	15710	4,8	12720	3,9	8570	2,6
20	5340	1	30480	5,7	36320	6,8	30700	5,7	28700	5,4	26950	5,0	26000	4,9
21	3300	1	9000	2,7	7600	2,3	4100	1,2					3600	1,1
22	4840	1	25510	5,3	33280	6,9	33190	6,9	22540	4,7	20010	4,1	13590	2,8
Durchsch.	3354													

9. Tabellenverzeichnis

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 10													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
10														
11	48680	1	62800	1,3	50230	1,0	42890	0,9	43430	0,9	33200	0,7	34540	0,7
12														
13	23400	1	35200	1,5	27400	1,2	27200	1,2	28600	1,2	26800	1,1	24100	1,0
14	4440	1	15990	3,6	8650	1,9	6250	1,4	6460	1,5	4490	1,0	4300	1,0
15	5600	1	11700	2,1	26400	4,7	32500	5,8	25700	4,6	9000	1,6	11800	2,1
16														
17														
18														
19	19650	1	22850	1,2	29550	1,5			25420	1,3			22410	1,1
20	14550	1	17120	1,2	34440	2,4	28390	2,0	27100	1,9	19380	1,3	20480	1,4
21	4200	1	14100	3,4	13700	3,3	9200	2,2	4200	1,0	3400	0,8	4400	1,0
22	31670	1	36670	1,2	30040	0,9	33380	1,1	33040	1,0	30520	1,0	28700	0,9
Durchsch.	19024													

9. Tabellenverzeichnis

3.Zyklus

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 1													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
10														
11														
12														
13	2900	1	25100	8,7	23300	8,0	23200	8,0	15400	5,3	13400	4,6	16700	5,8
14	4440	1	9990	2,3	8800	2,0	8790	2,0	7820	1,8	8560	1,9	7010	1,6
15	1560	1	3190	2,0	4380	2,8	5890	3,8	1700	1,1	3250	2,1	2030	1,3
16														
17														
18														
19	2530	1	13290	5,3			16500	6,5			13930	5,5	10930	4,3
20	5900	1	25360	4,3	18440	3,1	17130	2,9	18680	3,2	16240	2,8	12050	2,0
21	2800	1	2600	0,9	13200	4,7	2800	1,0	2800	1,0	2900	1,0	1700	0,6
22														
Durchsch.	3355													

9. Tabellenverzeichnis

Abnahme- Zeitpunkt	TAG 10													
	-6		0		0,5		1		2		6		16	
Patient Nr	absolut	relativ	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.	abs.	rel.
10														
11														
12														
13	14500	1	24400	1,7	25400	1,8	24400	1,7	17300	1,2	18800	1,3	16300	1,1
14	11310	1	11340	1,0	13650	1,2	12010	1,1	12110	1,1	10790	1,0	10970	1,0
15														
16														
17														
18														
19	19030	1	20380	1,1			27260	1,4			25380	1,3	21400	1,1
20	31530	1	38240	1,2	32150	1,0	30800	1,0	31820	1,0	31000	1,0	25700	0,8
21	30000	1	36000	1,2	29000	1,0	25000	0,8	23000	0,8	23700	0,8	18000	0,6
22														
Durchsch.	21274													

Tab. 8: ch14.18 Titer bei Patienten mit 10 Tagen pro Behandlungsblock absolut in ng/ml und relativ als x- facher Nullwert getrennt nach Zyklen und Behandlungstag.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. R. Handgretinger für die Überlassung des Themas und Herrn Professor Dr. med. D. Niethammer für die Aufnahme in sein Institut.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. H. Kreyenberg für die hervorragende Betreuung während der Arbeit und die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn PD Dr. R. Schwabe, dem ehemaligen stellvertretenden Leiter vom Institut für Medizinische Biometrie danke ich für die Herausarbeitung und Analysierung der Daten.

Dank gilt auch meinen Eltern Nuri und Kamile Dagdelen, die mir dieses Studium ermöglicht haben. Schließlich bin ich Dr. med. G. Durmus für die Durchsicht des Manuskripts und der stetigen Hilfe bei der Erstellung der Arbeit zum Dank verpflichtet.

Lebenslauf

von

Murat Dagdelen,

geboren am 25. November 1977

in Sindelfingen

Persönliche Daten:

.....

Eltern: Dagdelen, Nuri
 Dagdelen, Kamile

Ausbildungschronik:

.....

Schulbildung:

1984 – 1988 Johannes Widmann Grundschule in Maichingen
1988 – 1997 Gymnasium Unterrieden in Sindelfingen

Hochschulbildung:

10/97 - 10/00 Medizinstudium an der Universität Ulm
09/99 Ärztliche Vorprüfung
09/00 Erste Ärztliche Prüfung
10/00 - 05/04 Medizinstudium an der Eberhard- Karls- Universität
 Tübingen
04/03 Zweite Ärztliche Prüfung
06.05.2004 Dritte Ärztliche Prüfung